

Phylogenie und Phylogeographie eurasischer Viperinae  
unter besonderer Berücksichtigung  
der orientalischen Vipern der Gattungen  
*Montivipera* und *Macrovipera*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n



von Nikolaus Stümpel  
aus Braunschweig

1. Referent: apl. Professor Dr. Ulrich Joger

2. Referent: Professor Dr. Miguel Vences

eingereicht am: 19.09.2011

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.01.2012

Druckjahr 2012

### **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Stümpel, N. & U. Joger (2009): Recent advances in phylogeny and taxonomy of Near and Middle Eastern Vipers – an update. – Zookeys 31: 179-191.

### **Tagungsbeiträge**

Stümpel, N. & U. Joger: “First steps towards a molecular phylogeny of Near- and Middle East Mountain and Blunt-nosed vipers of the genera *Montivipera* and *Macrovipera*” – 2nd Biology of the Vipers conference, 24-27 September 2007, Porto, Portugal

Stümpel, N. & U. Joger: “Phylogeny of Near and Middle East Mountain and Blunt-nosed Vipers of the genera *Montivipera* and *Macrovipera* inferred by three mitochondrial markers” – 6th World Congress of Herpetology, 17-22 August 2008, Manaus, Brasil

Stümpel, N. & U. Joger: “Phylogeny of Near and Middle East Mountain and Blunt-nosed Vipers of the genera *Montivipera* and *Macrovipera* inferred by mitochondrial and nuclear markers” – 15th European Congress of Herpetology, 28th September to 2nd October 2009, Kuşadası, Turkey

Stümpel, N. & U. Joger: “Phylogeny and molecular clock analyses of west Palearctic Vipers based on complete mitochondrial genomes” – 3rd Biology of the Vipers conference, 31st March-2nd April 2010, Pisa, Italy

*Für meine lieben Eltern Klaus und Dorothee Stümpel, die mein exotisches Interesse toleriert  
haben und mich nach Kräften unterstützt haben.*

## Inhalt

1 Vorwort .....	1
2 Material und Methoden .....	5
2.1 Probenmaterial.....	5
2.1.1 Einleitung.....	5
2.1.2 Herkunft des verwendeten Probenmaterials.....	6
2.2 Chemikalien, Reagenzien, Kits, Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel .....	7
2.3 Laborgeräte .....	8
2.4 Labormethodik .....	8
2.4.1 DNA-Isolierung .....	8
2.4.2 PCR Methoden.....	9
2.4.2.1. Auswahl der Markergene .....	9
2.4.2.2 Primerdesign .....	13
2.4.2.3 Amplifizierung proteincodierender mt-Genes.....	15
2.4.2.4 Amplifizierung vollständiger mt-Genome mit Hilfe der long and accurate PCR .....	16
2.4.2.5 Amplifizierung von Kerngenen .....	21
2.4.2.6 Aufreinigung der PCR-Produkte .....	24
2.4.3 DNA-Sequenzierung .....	24
2.4.3.1 Cycle-Sequencing (Sanger Reaktion) .....	25
2.4.3.2 Aufreinigung der Cycle-Sequencing-Produkte .....	25
2.4.3.3 Sequenzierung und Assembling .....	26
2.5 Analytische Methoden .....	26
2.5.1 Alignments.....	26
2.5.2 Annotation der Mitogenome .....	28
2.5.3 Stammbaumrekonstruktion und -validierung.....	29
2.5.3.1 Sättigungsanalysen.....	29
2.5.3.2 Berechnung des Evolutionsmodells .....	31
2.5.3.3 Wahl der Außengruppen .....	32
2.5.3.4 Evaluation von Stammbäumen („Branch-support“) .....	32
2.5.3.5 Rekombinationsanalyse .....	33
2.5.3.6 Kongruenz-Test verschiedener Topologien.....	34
2.5.3.7 Maximum Parsimonie (MP).....	34
2.5.3.8 Maximum Likelihood (ML).....	35
2.5.3.9 Bayesianische Inferenz (BI).....	36
2.5.4 Phylogeographie.....	37
2.5.5 Kalibrierung einer molekularen Uhr.....	38
2.5.6 Dispersal-Vicariance-Analyse .....	44
2.5.7. Historische Populationsdemographie .....	44
3 Phylogenie der Viperinae auf Basis vollständiger mt-Genome .....	46
3.1 Einleitung.....	46
3.2 Ergebnisse .....	49
3.2.1 Sequenz- und Sättigungsanalyse .....	49
3.2.2 Bayesianische Phylogenie.....	51

3.2.3 mt-Genomorganisation der Viperinae .....	54
3.3 Diskussion .....	57
4 Divergenzzeiten der Viperinae auf der Basis vollständiger mt-Genome .....	64
4.1 Einleitung .....	64
4.2 Ergebnisse .....	67
4.2.1 Auswirkung verschiedener „Relaxed-clock-models“ und „Tree-priors“ auf die Knotendivergenzzeiten .....	67
4.2.2 Divergenzzeiten der Amnioten .....	70
4.3 Diskussion .....	73
5 Phylogenie eurasischer Viperinae .....	81
5.1 Einleitung .....	81
5.2 Ergebnisse .....	84
5.2.1 Sequenz- und Sättigungsanalyse .....	84
5.2.2 Phylogenie auf Basis konkatenierter Mitochondrien- und Kerngene .....	86
5.2.3 Phylogenie auf Basis von Kerngenen .....	91
5.2.3.1 Sequenz- und Sättigungsanalyse .....	91
5.2.3.2 Bayesian Inferenz .....	92
5.2.4 Kongruenztest verschiedener phylogenetischer Methoden .....	94
5.3 Diskussion .....	97
6 Divergenzzeiten eurasischer Viperinae .....	105
6.1 Einleitung .....	105
6.2 Ergebnisse .....	108
6.3 Diskussion .....	110
7 Phylogenie orientalischer Viperiden der Gattungen <i>Macrovipera</i> , <i>Montivipera</i> , <i>Daboia</i> , <i>Eristicophis</i> und <i>Pseudocerastes</i> .....	121
7.1 Einleitung .....	121
7.2 Ergebnisse .....	124
7.2.1 Sequenz- und Sättigungsanalyse .....	124
7.2.2 Phylogenie .....	126
7.3 Diskussion .....	132
8 Phylogeographie der Gattungen <i>Montivipera</i> und <i>Macrovipera</i> .....	142
8.1 Einleitung .....	142
8.2 Ergebnisse .....	144
8.2.1 Phylogeographie .....	144
8.2.2 Populationsdemographie .....	151
8.3 Diskussion .....	153
9 Historische Biogeographie der Viperinae .....	167
9.1 Einleitung .....	167
9.2 Ergebnisse .....	171
9.3 Diskussion .....	185
10 Literaturverzeichnis .....	201
Zusammenfassung .....	238
Danksagung .....	244

## Verzeichnis der Abkürzungen

% = Prozent

> = größer

< = kleiner

°C = Grad Celsius

‰ = Promille

A = Adenin

BI = Bayesian Inference

bp = Basenpaare

BS = Bootstrap

C = Cytosin

ddNTPs = Didesoxyribonukleosid-Triphosphate

dH<sub>2</sub>O = destilliertes Wasser

DNA = Desoxyribonukleinsäure

dNTPs = Desoxyribonukleosid-Triphosphate

ESS = Effective sample size

EtOH = Ethanol

gr = Gramm

G = Guanin

ka = Kiloannum

kb = Kilobyte

MCMC = Markov Chain Monte Carlo

mg = Milligramm

Min. = Minute

ml = Milliliter

ML = Maximum Likelihood

mm = Millimeter

MMCO = Middle Miocene Climate Optimum

MN = Mammal Neogene

MP = Maximum Parsimony

MRCA = Most recent common ancestor

mt = Mitochondrium, mitochondrial

n = Stichprobenumfang

N = Populationsgröße

nc = Nukleolus, nukleär

Ne = effektive Population

nt = Nukleotide

OIS = Oxygen isotopic stage

ORI = Origin of replication

p = Statistische Irrtumswahrscheinlichkeit

PCR = Polymerase Kettenreaktion

PETM = Paläozän Eozän Temperaturmaximum

pmol = Pikomol

PP = Posterior Probability

rpm = Umdrehungen pro Minute

s.l. = sensu lato

s.str. = sensu stricto

SCN = Single copy Kerngen

Sek. = Sekunde

SLS = Sequencing separation buffer

T = Thymin

TEE = Terminal Eocene Event

TMRCa = Time to most recent common ancestor

Ts = Transitionen

Tv = Transversionen

vergl. = vergleiche

vs. = versus

μl = Mikroliter

$\bar{X}$  = arithmetisches Mittel

## 1 Vorwort

Schlangen polarisieren. Sie lösen beim Menschen Faszination oder Abscheu aus. Entsprechend ambivalent ist ihre Rolle in der Kulturgeschichte der Menschheit. Im alten Ägypten war die Uräusschlange (*Naja haje*) Personifikation der Schutzgöttinnen Nechet und Wadjet und wurde auch für die Königssymbolik verwendet (Tubach 2007). Die Uräusschlange vereint in sich eine Dialektik. Auf der einen Seite hatte sie trotz oder gerade wegen ihrer Giftigkeit eine Unheil abwehrende (apotropäische) Bedeutung. Auf der anderen Seite symbolisiert die Schlange in Gestalt des dämonischen Gottes Apophis in der ägyptischen Mythologie das Böse, das immer wieder aufs Neue vom Sonnengott Re bei seiner Einfahrt in die Unterwelt besiegt werden musste (Tubach 2007). So wählte Kleopatra nicht zufällig den Biss einer Giftschlange für ihren Freitod und beendete damit die pharaonische Ära.

Auch in der griechischen Mythologie hat das Wesen der Schlange Doppelseitigkeit (Joger & Luckhardt 2007). Schlangen sind sowohl ein Symbol von Ungeheuern als Personifikation des Bösen, als auch mit der Heilkunst assoziiert, deren Sinnbild der Heilgott Asklepios war. Asklepios (lateinisch Aesculapius, deutsch Äskulap) ist in der griechischen Mythologie der Gott der Heilkunst. Ihm wurde in den Heiligtümern, genannt Asklepieion, gehuldigt, die gleichzeitig als Sanatorium fungierten. Dargestellt wurde Asklepios als bärtiger Mann, der auf einen Stab gestützt ist. Der Stab, von einer Schlange umwunden, ist auch heute noch das Symbol der Apotheke.

Im christlichen Okzident galt die Schlange bis in die Gegenwart jedoch hauptsächlich als Symbol des Bösen. Dies fußt vor allem auf der biblischen Darstellung des Sündenfalls, in der die Schlange schuld an der folgenreichen Vertreibung von Adam und Eva aus dem Paradies war. In nachalttestamentlicher Zeit wurde die Schlange zunehmend mit Satan assoziiert (Tubach 2007).

Bis zum Barock blieb die Schlange ein mystisches Wesen. Im Zeitalter der Aufklärung und der Berufung auf die Vernunft als Urteilsinstanz wurde nun auch die Schlange wissenschaftlich betrachtet. So wurde der italienische Arzt Francesco Redi durch seine Untersuchungen *„Osservazioni intorno alle vipere“* (1664) zu einem Vordenker der Schlangenforschung.

Nach Einführung der binären Nomenklatur begann die systematische Beschreibung der europäischen Herpetofauna. In seinem 1758 erschienenen Werk *„Systema Naturæ“* erfasst Carl von Linné auch vier europäische Vipernarten. Die meisten europäischen Vipernarten wurden jedoch zu einer Zeit entdeckt, in der durch die industrielle Revolution und den finanziellen Reichtum kostspielige Forschungs- und Entdeckungsreisen in ferne Länder



gefördert werden konnten. Nur wenige zoologische Werke aus dieser Zeit, wie die Enzyklopädie „*Brehms Tierleben*“ (1869), widmeten sich dieser Tiergruppe. Die Systematik und Diversität eurasischer Viperinae<sup>1</sup> erfasste erstmals Schwarz (1936), in einem bis heute viel zitierten Klassiker. Das wissenschaftliche und populäre Interesse an dieser Tiergruppe ist seither merklich gestiegen. Zahlreiche wissenschaftliche und autodidaktische Monographien legen nun ihr Augenmerk auf diese Tiergruppe (Psenner 1940, Joger 1984, Bruno 1985, Brodmann 1987, De Smedt 2001, Joger & Stümpel 2005c, Phelps 2010). In der modernen Wissenschaft ist die Schlange längst zu einem Modellorganismus für ökologische und Life-history-Untersuchungen geworden (Shine & Bonnet 2000).

Erkenntnisse aus Biodiversität und Stammesgeschichte (Phylogenie) sind die Grundlage der Systematik und die Voraussetzung anderer biologischer Forschungsdisziplinen.

Das Wissen um die Verwandtschaft der Giftschlangen stellt ein gutes Beispiel für die Verknüpfung zwischen Grundlagen- und angewandter Forschung dar. Viperiden sind in Schwellen- und Drittweltländern, in denen keine adäquate medizinische Versorgung gewährleistet ist, ein ernst zu nehmendes epidemiologisches Problem (Chippaux 2008), so dass man der Herstellung von Antiseren bedarf. Weil sich die Zusammensetzung und Wirkungsweise von Viperngiften in Abhängigkeit von der Artzugehörigkeit und dem Nahrungsspektrum stark unterscheiden, sind für eine effektive Antiserumherstellung und -therapie valide taxonomische Verhältnisse entscheidend, die wiederum ohne robuste phylogenetische Hypothesen nicht gewährleistet sind. Darüber hinaus werden Viperntoxine in der klassischen Schulmedizin genauso wie in der Homöopathie als Therapeutikum eingesetzt.

Bis in die 1980er Jahre beschränkte sich das Handwerkszeug der Systematiker auf äußerliche, morphologische Merkmale, die jedoch häufig zu inkonsistenten Verwandtschaftshypothesen führten (z.B. Mertens & Wermuth 1960, Saint Girons 1978, Groombridge 1980, Obst 1982, Marx et al. 1988, Nilson & Andrén 1986a, Schätti et al. 1991).

Das enorme Potential der sich in den 1980er und 90er Jahren rasant entwickelnden molekulargenetischen Methoden wurde auch für die Systematik erkannt und genutzt. Mit der Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Kleppe (1971) und Kary Banks Mullis (1983) und der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) wurde es nun möglich, in kurzer Zeit Sequenzen ausgewählter Genomabschnitte zu identifizieren und die evolutionäre Information der DNA für die Stammbaumrekonstruktion zu nutzen. Der methodische Umbruch war die Renaissance der Phylogenetik.

---

<sup>1</sup> Eurasische Viperinae umfassen nach Herrmann & Joger (1997) die Gattungen *Vipera*, *Macrovipera*, *Montivipera*, *Daboia*, *Eristicophis*, *Pseudocerastes*.

Die Vorzüge gegenüber morphologischen Merkmalen für die Phylogenie lagen auf der Hand. Während die Anzahl zur Verfügung stehender homologer morphologischer Merkmale für die Stammbaumrekonstruktion deutlich limitiert ist, bietet das Genom beinahe unbegrenzt viele Merkmale.

Erstmals nutzten Herrmann et al. (1999) und Lenk et al. (2001) Gensequenzen zur Rekonstruktion der Stammesgeschichte altweltlicher Viperinae. Der Datensatz von Lenk et al. (2001) umfasste jedoch nur 16 Taxa (OTUs) repräsentativer eurasischer Vipern, der jedoch die Monophylie von *Vipera*, *Montivipera*, *Macrovipera*, *Daboia* und *Eristicophis/Pseudocerastes* bestätigte. Durch die unklare Position von *Vipera* in der Phylogenie blieben die verwandtschaftlichen Stellungen der Gattungen zueinander jedoch teilweise fragwürdig. In einer späteren Untersuchung von Garrigues et al. (2005) mit einem vollständigeren Datensatz eurasischer Viperinae verfehlten es die Autoren, robuste Stammbäume zu berechnen. Phylogenetische Untersuchungen über die Großgruppen eurasischer Viperinae verschwanden aus dem Blickpunkt stammesgeschichtlicher Forschungen. Im Focus aktueller Forschung standen nun einzelne Artengruppen, wie *Pelias* (Kalyabina-Hauf et al. 2004, Ursenbacher et al. 2006) und *Vipera aspis* (Ursenbacher et al. 2006, Barbanera 2009) sowie *Vipera ammodytes* (Ursenbacher et al. 2008). Nahezu unberücksichtigt blieben bisher die Gattungen *Montivipera* und *Macrovipera* sowie der Artkomplex *Vipera latastei*. Bisweilen wurde die Phylogenie, insbesondere der Bergottern (*Montivipera*), so kontrovers diskutiert, dass Wüster et al. (1997) feststellten: "Until a full analysis of the population phylogeny of these forms is carried out, using large samples and preferably a wide range of characters, and in particular molecular markers, the situation is likely to remain confused." (S.335). Diese fehlende phylogenetische Darstellung will ich nun mit vorliegender Arbeit liefern.

Den systematischen Aufbau der Kapitel wählte ich so, dass sich die Perspektive von einer „globalen“ Sicht auf den Stammbaum zu einem detaillierten Focus entwickelt.

In den ersten Kapiteln verfolge ich daher das Ziel, eine robuste Phylogenie eurasischer Viperinae (Kapitel 3) sowie ihrer Divergenzzeiten (Kapitel 4) durch die Analyse eines großen Sequenzdatensatzes mit vollständigen mt-Genomen zu etablieren. In den beiden sich anschließenden Kapiteln (5 und 6) reduziere ich die Loci zugunsten eines vollständigen Taxonsamplings, das nahezu die gesamte nominelle Diversität eurasischer Viperinae erfasst und ihre stammesgeschichtliche Entwicklung beleuchtet. In den Kapiteln 7 und 8 verlasse ich die „globale“ Ebene und richte die Aufmerksamkeit dann auf die Phylogenie und Phylogeographie der beiden Gattungen *Macrovipera* und *Montivipera*.

---

Die Dissertation gliedert sich, abgesehen vom Vorwort und dem Kapitel zum Material und der Methodik, in sieben thematisch eigenständige Kapitel, jeweils bestehend aus Einleitung, Ergebnis und Diskussion. Die kapitelspezifischen Einleitungen führen in das Thema ein, fassen den Status quo der Wissenschaft zusammen und werfen die zu untersuchenden Fragen auf. Die anschließenden Ergebnisse präsentieren die experimentellen Teile der Dissertation, die im Lichte der aktuellen Forschung diskutiert werden. Um Redundanzen und Wiederholungen zu vermeiden, verzichtete ich auf gesonderte Material-Methodenteile der jeweiligen Kapitel zugunsten eines einzigen Material- und Methodenteils, der allen Kapiteln vorangestellt ist. Gleiches gilt für das Literaturverzeichnis, das als Zitatnachweis aller Kapitel den Abschluss bildet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probenmaterial

#### 2.1.1 Einleitung

Das Sammeln, Lagern und Archivieren von Proben sind die Voraussetzungen für die Akquise molekularer Daten für phylogenetische oder populationsgenetische Analysen.

Mit Beginn der Aufklärung im 17. und 18. Jahrhundert wurden Gegenstände aus der belebten und unbelebten Natur in sogenannten Naturalienkabinetten zur Schau gestellt. Im Verlauf des 19. Jahrhunderts wurden die Naturalienkabinette von spezialisierten Naturkundesammlungen mit wissenschaftlichem Anspruch abgelöst. Bis in die heutige Zeit werden Squamaten in wissenschaftlichen Sammlungen traditionell als Flüssigpräparate in alkohol- und aldehydhaltigen Lösungen bei Raumtemperatur konserviert. Während Flüssigpräparate für morphologisch anatomische Studien beinahe unbegrenzt lagerungsfähig sind, ist das Alter eines Präparates für die molekulargenetische Analyse ein entscheidendes Kriterium. Fixative und äußere Bedingungen, denen die Proben bei der Langzeitlagerung ausgesetzt sind, haben einen starken Einfluss auf die Qualität der DNA.

DNA ist ein relativ instabiles biologisches Molekül. In metabolisch aktiven, lebenden Zellen wird die Integrität der DNA-Moleküle durch enzymatische Reparaturmechanismen aufrechterhalten (Lindahl 1993). Nach dem Tod eines Organismus kollabieren Zellkompartimente und katabolische Enzyme, wie Nukleasen, beginnen, zelluläre DNA zu degradieren. Der enzymatische Abbau der DNA ist auf einen kurzen Zeitraum unmittelbar nach dem Zelltod beschränkt; nicht so oxidative und hydrolytische Effekte, die post mortem permanent Nukleinsäuren modifizieren. Hydrolyse und Oxidation führen zu Einzelstrangbrüchen in der DNA (Pääbo et al. 2004, Mitchell et al. 2005). Die progressiv fortschreitende Fragmentation führt mit der Zeit zum völligen Zerfall der Nukleotidkette. Unter Annahme einer physiologischen Salzkonzentration, eines neutralen pH-Werts und einer Temperatur von 15° C dauert es nach Hochrechnungen 100.000 Jahre bis genomische DNA durch Hydrolyse zu Mononukleotiden degradiert ist (Pääbo & Wilson 1988, Lindahl 1993).

Der nichtenzymatischen DNA-Degradierung sind auch Museumspräparate ausgesetzt, insbesondere wenn sie suboptimal konserviert und gelagert wurden. Seit dem 19. Jahrhundert wurden in Naturkundesammlungen traditionell formaldehydhaltige Alkohole verwendet.

Methanol, Propanol oder Formaldehyd sind jedoch als Fixative für molekulare Untersuchungen ungeeignet (DeSalle et al. 2002). Präparate, die in formaldehyd- oder

vergällungsmittelhaltigen Alkoholen konserviert waren, enthalten schon nach kurzer Zeit keine hochmolekulare DNA mehr. Wichtiges Sammlungsmaterial ist somit bis dato für die Molekularbiologie unbrauchbar. Selbst in Ethanol gelagerte Proben degradieren bei Raumtemperatur bereits nach sechs Wochen (Reiss et al. 1995).

### 2.1.2 Herkunft des verwendeten Probenmaterials

Die orientalischen Vipern der Gattungen *Montivipera* und *Macrovipera* sind in nahezu keiner wissenschaftlichen Sammlung umfassend und vollständig vertreten. Dafür sind im Wesentlichen folgende Gründe zu nennen: Bei den untersuchten Taxa handelt es sich teilweise um seltene Arten, die isolierte Hochgebirge im Nahen und Mittleren Osten bewohnen. Aufgrund ihrer versteckten Lebensweise werden sie nur sporadisch gefunden und sind deswegen nur in geringen Stückzahlen in Museumssammlungen repräsentiert. Zudem liegen die Verbreitungsareale der Arten aus heutiger Sicht in politischen Krisenregionen, die nur eingeschränkt bereist werden können.

Das Probenmaterial wurde aus unterschiedlichen Quellen zusammengetragen. Für die Phylogenie/Phylogeographie der orientalischen Vipern wurden insgesamt mindestens 175 Proben sequenziert (siehe Tabelle 1 und Appendix A), die zu 22,5 % aus Museumssammlungen stammen. Der überwiegende Teil des Probenmaterials wurde von Kollegen oder privaten Sammlungen bereitgestellt oder auf eigenen Forschungsreisen 2003 und 2004 selbst gesammelt.

Für die Gesamtphylogenie eurasischer Viperinae wurden weitere 109 Proben der Gattung *Vipera* sequenziert (Appendix A, B), die zu 100 % aus privaten Sammlungen bzw. von Kollegen akquiriert wurden.

Neun mt-Genome sequenzierte ich für die Berechnung der Großgruppenphylogenie de novo und ergänzte den Datensatz durch weitere 43 mt-Genome, die ich der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnahm.

Tabelle 1: Übersichtsstatistiken zu den von mir erhobenen Datensätzen. Genauere Angaben zu den Proben finden sich in den Anhängen A bis C. Der Datensatz 5434 ist eine Verkettung aus den Datensätzen 1920 und 3514. mt = mitochondrial, nc = nukleär, OTUs = operational taxonomic units, n = Stichprobenumfang

Organismengruppe	Name	(n) OTUs in	de novo	Nukleotide	Fremdsequenzen	Anhang
	Datensatz	Berechnung	sequenzierte Gene (n)	total (n)	(OTUs) Datenbank	
orientalische Viperinae	2566	175	Cytb (175), COI (173), ND5 (173)	2566	3	A
eurasische Viperinae (mt)	1920	71	Cytb (108), COI (97)	1920	0	B
eurasische Viperinae (nc)	3514	71	Rag1 (75), Bach1 (72)	3514	0	A,B
eurasische Viperinae	5434	71	Verkettung aus 1920+3514	5434	0	A,B
Großgruppenphylogenie	3542	52	komplette mt-Genome (9)	10626	43	C

## 2.2 Chemikalien, Reagenzien, Kits, Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Alle im Labor verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Kits, Hilfsmittel sowie Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Chemikalien, Puffer, Lösungen, Enzyme, Oligos, Kits und Verbrauchsmaterialien.

Chemikalien, Puffer, Lösungen, Enzyme, Oligos, Kits	Hersteller	Verwendungszweck
Agencourt CleanSEQ Magnetic Beads	Beckman Coulter	Aufreinigung PCR Produkte
Glycogen	Beckman Coulter	Aufreinigung PCR Produkte
QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen	Aufreinigung PCR Produkte
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich	Aufreinigung PCR Produkte
NaAc 3 M (Sodium-Acetat-Puffer)	Sigma-Aldrich	Aufreinigung PCR Produkte
dH <sub>2</sub> O	DSMZ	divers
Ethanol C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (absolut)	J.T. Baker	divers
PBS (Phosphate-buffered Saline)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	DNA Extraktion
DNeasy Blood & Tissue Kit	Quiagen	DNA Extraktion
Proteinase K	Quiagen	DNA Extraktion
TBE (Tris-Borat- EDTA-Puffer) 10X	1 M Tris, 89 mM boric acid, 10 mM EDTA, pH 8,6	Elektrophorese
TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) 50X	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 10 ml EDTA 0,5 mol/L, pH 8,0	Elektrophorese
Loading Puffer	7 ml 0,1 M EDTA, 3 ml Glycerol, 1 Spatelspitze Bromphenol Blau	Elektrophorese
SeaKem LE-Agarose	Biozym	Elektrophorese
SYBR Safe™ DNA gel stain	Molecular Probes	Elektrophorese
Molecular Weight Marker, II, III, VIII	Roche	Elektrophorese
Ethidium Bromid	Serva	Elektrophorese
PCR Tubes (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf	PCR
Betain	Promega	PCR
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Quiagen	PCR
BSA (Bovin Serum Albumin)	Sigma	PCR
10x Ex Taq buffer	TaKaRa Bio Inc.	PCR
dNTP Mixture	TaKaRa Bio Inc.	PCR
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	TaKaRa Bio Inc.	PCR
Taq DNA Polymerase (Ex Taq und LA Taq)	TaKaRa Bio Inc.	PCR
Oligos/Primer	Metabion	PCR
DNA Separ. Capillary Array	Beckman Coulter	Sequenzierung
DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter	Sequenzierung
Sample Loading Solution	Beckman Coulter	Sequenzierung
Separation Gel	Beckman Coulter	Sequenzierung
Sequencing Separation Buffer (SLS)	Beckman Coulter	Sequenzierung
Mineralöl	Sigma-Aldrich	Sequenzierung
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
Latex-Handschuhe	Semperguard	divers
Nitril-Handschuhe	Dermatril	divers
Laboratory Film 4Inx125FT. PM-996	Parafilm	divers
Pipettenspitzen (0,5-20 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl)	Eppendorf	divers
Reaktionsgefäße Safelock (1,5 ml, 0,5 ml)	Eppendorf	divers
Petrischalen	Greiner	Probenpartitionierung
Skalpellklingen	Bayha	Probenpartitionierung
96-Well Plates	Beckman Coulter	Sequenzierung

## 2.3 Laborgeräte

Für die Untersuchungen wurden folgende Laborgeräte verwendet: Autoklave Thermo Scientific, Capillary Sequencer SEQ<sup>TM</sup>8000 Beckman Coulter, DNA Speed Vac Savant DNA110, Gelelektrophoresesystem Horizon Life Technologies, Gelfotosystem Kodak Edas 290, Gefrierschrank Liebherr Premium No Frost (-20°C), Gefrierschrank GFL (-80°C), Mikrowelle Sharp 800 Watt, Minishaker IKA MS1, Pipetten (Gilson: 10-100 µl, 20-200 µl 100-1000 µl, Eppendorf: 0,5-10 µl), Power Pac Basic Bio Rad, Thermocycler (Eppendorf Master Cycler Gradient), SPRIplate 96-Ring Agencourt Bioscience Corporation, Sterilbank Heraeus Lamin Air, Transilluminator Biometra TI1, Trockenschrank Memmert Loading Modell 100-800, Thermomixer Compact Eppendorf, Waage Sartorius MC1, Water Purification System Milli-Q AdvantageA10, Zentrifugen Eppendorf (5415D, 5424) 2.4 Labormethodik

## 2.4 Labormethodik

### 2.4.1 DNA-Isolierung

Die Präparation genomischer DNA erfolgte durch Zellyse und enzymatische Behandlung mit anschließender Isolierung über Anionenaustauscher-Säulen (Spin-Columns) unter Zuhilfenahme eines kommerziell erhältlichen Kits (DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit, Qiagen). DNA wurde bevorzugt aus Skelettmuskeln oder Blut isoliert, in einigen Fällen auch aus Herz- und Lebergewebe, ausnahmsweise auch von Bauchschuppen oder Exuvien. Um das Überladen der Spin-Columns zu vermeiden, wurde das Ausgangsmaterial zur DNA-Isolierung vereinzelt und den vom Hersteller empfohlenen Mengen angepasst. Gewebeproben wurden zu je 25 mg und konserviertes Blut in 40 µl Volumina partitioniert. Die Menge der Exuvien wurde so gewählt, dass diese, auf den Boden eines 2 ml Eppendorf Tubes gepresst, von einem doppelten Ansatz Pufferlösung (360 µl) gut bedeckt waren.

Um mögliche inhibierende Effekte des zur Probenkonservierung verwendeten Ethanol auf die Zellyse zu vermeiden, wurde das Probenmaterial in einer Vakuumzentrifuge (DNA Speed-Vac) für wenige Minuten bei mittlerer Hitze (50°C) zur Trockne eingedampft. Anschließend wurden die Proben in einem Thermoschüttler mit 180 µl ATL-Pufferlösung und 20 µl Proteinase K bei 56°C bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Das Lysat wurde anschließend mit 200 µl Puffer AL versetzt, gevortext und erneut mit 200 µl 96% EtOH versetzt und wieder gevortext. Sodann wurde die Flüssigkeit in ein DNeasy-Spin-Column pipettiert und 1 Min. bei 8000 rpm (>6000 g) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Spin-Column in ein neues Sammelgefäß gesteckt und mit 500 µl Puffer AW1 für 1 Min. bei 8000 rpm (>6000 g) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und das Spin-Column in ein neues Sammelgefäß überführt. In dem nun letzten Waschschrift

wurde das Spin-Column mit 500 µl Puffer AW2 für 3 Min. bei 14.000 rpm (20000 g) zentrifugiert. Bei der anschließenden Eluierung wurde das Spin-Column in ein autoklaviertes 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und 120 µl Elutionspuffer AE zugegeben. Nach 1 Min. Inkubationszeit wurde die DNA bei 8000 rpm eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei 8°C gelagert.

## **2.4.2 PCR Methoden**

### **2.4.2.1. Auswahl der Markergene**

Genomische Information kann in vielfältiger Weise für die molekulare Systematik verwendet werden. Vorhersagen, welche Genregionen für eine phylogenetische Hypothese am besten geeignet sind, können a priori nicht getroffen werden. Häufig bestimmt allein der empirische Versuch das entscheidende Kriterium im Für und Wider der Markerwahl.

Die Auswahl der Markergene für phylogenetische oder phylogeographische Analysen ist nicht nur abhängig von der zu untersuchenden Fragestellung, sie reflektiert vor allem auch die technischen Möglichkeiten der Zeit.

In einer der ersten molekular-systematischen Studien zur Verwandtschaft der Hominiden verwendeten Sarich & Wilson (1967) Serum-Albumine für immunologische Kreuzreaktionen. Bis in 1980er Jahre dienten Proteine als dominierende Informationsquelle für systematische Studien. Erst mit der Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Kleppe (1971) und Kary Banks Mullis (1983) (siehe Hongbao 2005) erfuhr die Systematik eine Renaissance. Die PCR ermöglichte die schnelle Amplifizierung ausgewählter Genabschnitte auch von geringen Mengen an Ausgangsmaterial, wie z.B. Haarwurzeln. In Kombination mit der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) war es gewährleistet, in kurzer Zeit Sequenzen ausgewählter Genomabschnitte zu identifizieren und die evolutionäre Information der DNA für die Stammbaumrekonstruktion zu nutzen.

Bis in die 1990er Jahre wurden für Tier-Phylogenien nahezu ausschließlich Mitochondriengene sequenziert. Mehrere Eigenschaften machen sie zum prädestinierten Marker für Systematiker und Populationsbiologen (z.B. Avise 1986, Ballard & Rand 2005). Im Unterschied zum Genom des Zellkerns, das nur einmal in jeder Zelle vorhanden ist (single copy), liegen Mitochondrien als 1000fache Kopie (multi copy) pro Zelle vor (Gillham 1978). Mitogenome lassen sich daher aus geringsten Mengen Zellmaterial isolieren. Mutagene Reaktionen während der oxydativen Phosphorylierung (Finkel & Holbrook 2000) und ein ineffizienter DNA-Reparaturmechanismus (Brown et al. 1979) führen zur schnellen Ansammlungen von Mutationen (Rand 2001). Neutrale genetische Drift ist wegen unterschiedlicher effektiver Populationsgrößen in mt-Genomen um das Vierfache schneller



als im Kerngenom (Brito & Edwards 2009). Zudem wird mt-DNA ausschließlich maternal vererbt und Rekombination stellt ein seltenes Ereignis dar (Ladoukakis & Zouros 2001). Schließlich spielt auch die Praktikabilität eine Rolle. Die stetig wachsende Anzahl kompletter Mitochondriengenome in Sequenzdatenbanken erhöht die Auswahl von Referenzsequenzen.

Erkenntnisse aus der Koaleszenztheorie (Kingman 1982a,b) sowie Simulationen und empirische Beobachtungen über das Verhalten von mt-Genen in Populationen (Avice 2000) haben gezeigt, dass Genbäume verschiedener Loci substantiell voneinander abweichen können.

Weil Mitochondrien als Einheit (linkage block) vererbt werden, können ihre Gene nicht als unabhängige phylogenetische Quellen betrachtet werden (Brown 1985, Harrison 1989). Der Nutzen mitochondrialer Daten auf niedrigem taxonomischen Level kann daher wegen unvollständiger Linien-Aufspaltung (lineage sorting) und Introgression (Funk & Omland 2003) problematisch sein. Gleichzeitig evolvieren Mitochondrien so schnell, dass ihre Sequenzen, angereichert mit Mehrfachsubstitutionen, für Großgruppen-Phylogenien ungeeignet sein können (Townsend et al. 2008).

Die Erkenntnisse aus der Genbaumheterogenität haben berechtigte Kritik über Single-Locus-Phylogenien aufkommen lassen. Seit Anfang der 1990er Jahre rücken daher zunehmend Kernmarker in den Blickpunkt der Phylogenetiker.

Das Kerngenom bietet mit Protein-, RNA- und nicht-codierenden Regionen eine Vielfalt unabhängig evolvierender Marker, die potentiell für alle Fragestellungen der Phylogenetik und Populationsgenetik in Betracht kommen. Die Entwicklung eines Kernmarkers ist jedoch historisch bedingt ungleich schwerer als die eines mt-Markers, weil weniger Referenzsequenzen zur Verfügung stehen. Erst die Sequenzierung vollständiger Genome brachte in jüngster Zeit den Durchbruch für die Entwicklung von Kernmarkern. Mithilfe spezieller Screening-Verfahren konnten die Referenzgenome nun gezielt nach geeigneten Genregionen durchsucht werden (Townsend et al. 2008). Kerngene sind in der Phylogenetik Segen und Bürde zugleich. Kerngene können im Laufe der Evolution dupliziert werden. Ihre Kopien sind in sogenannten Genfamilien tandemartig aneinander gereiht. Genfamilien selbst können ebenfalls durch Verdopplungsmechanismen vermehrt werden. Alle Mitglieder einer Genfamilie gehen auf einen Ursprung zurück und sind im weiteren Sinn homolog. Durch Anpassung an unterschiedliche Stoffwechselprozesse evolvieren sie allerdings unabhängig voneinander, man spricht von Paralogen. Jedes Paralog kann in einer anderen Spezies ein Ortholog haben. Orthologe Gene sind funktional entsprechende Mitglieder einer Genfamilie. So haben sich beispielsweise Globin-Gene im Laufe der Evolution schrittweise verdoppelt. Paraloge Säugetier-Hämoglobin-Gene sind in embryonale, fötale und adulte

Hämoglobine differenziert, die in unterschiedlichen Ontogenesestadien exprimiert werden (z.B. Henning 2006).

Weil die Zielsequenz der amplifizierten Gene in der Regel völlig unbekannt ist, besteht in der Phylogenetik die Gefahr, paraloge Kerngene miteinander zu vergleichen. Ein Genbaum paraloger Gene reflektiert nicht die wahre evolutionäre Geschichte (z.B. Koonin 2005). Paraloge sind methodisch nur äußerst schwer nachweisbar (Townsend et al. 2008).

Nicht-codierende Regionen des Kerngenoms wie Introns, rRNA-loops oder intergenische Sequenzen evolvieren relativ schnell und sind damit geeignet, evolutionäre Prozesse zwischen jungen Taxa aufzudecken (z.B. Dolman & Phillips 2004, Sequeira et al. 2006, Weibel & Moore 2002, Willows-Munro et al. 2005). Hochvariable Regionen sind allerdings wegen ihrer Längenpolymorphismen schwer zu alignieren (Matthee et al. 2001, Sequeira et al. 2006, Sotoadames et al. 1994). Ganz anders verhalten sich proteincodierende Kerngene, die zwar weniger variabel aber dafür leichter alignierbar sind (Boekhorst & Snel, 2007). Mit ihrer Hilfe lassen sich alte Aufspaltungen zwischen entfernt verwandten Arten und Gattungen entschlüsseln. Ihr Nutzen auf inter- oder intraspezifischer Ebene ist jedoch möglicherweise limitiert (z.B. Jesus et al. 2002).

Ein in der Phylogenetik besonders interessanter Ansatz bietet der Vergleich geschlechtsspezifischer Marker. Der Erbgang haploider Chromosomen bietet die Möglichkeit, paternale und maternale Evolutionsmuster zu vergleichen. Ist das heterogametische Geschlecht männlich (XY Chromosomenkonstitution), können paternal vererbte Loci des Y-Chromosoms mit maternal vererbten Genen des mt-Genoms verglichen werden. Das Schlangengenom eignet sich jedoch nicht wegen der WZ-Chromosomenkonstitution (Weibchen sind heterogametisch) für diesen Vergleich (Manolakou et al. 2006).

Proteincodierende Kerngene sind eine vielversprechende Alternative zu mt-Genen, die jedoch neue Herausforderungen mit sich bringen. Gene diploider Chromosomen liegen meist in zwei Allelen vor. Heterozygote Sequenzen müssen aufwendig editiert und zur Rekonstruktion von Haplotypen mit bioinformatischen Algorithmen nachbearbeitet werden (Harrigan et al. 2008).

Die Verfügbarkeit publizierter proteincodierender Kernmarker für die phylogenetische Stammbaumrekonstruktion bei Squamaten ist immer noch überschaubar, obgleich in jüngster Vergangenheit die Anzahl vollständiger Genome drastisch gestiegen ist. Townsend et al. (2008) führen diesen Umstand im Wesentlichen auf zwei Gründe zurück. Diese bestehen zum einen in Schwierigkeiten bei der Erkennung von Exon-Intron-Grenzen und zum anderen in der schieren Größe der Genome, die das Auffinden potentieller Loci ohne automatisierte Erkennungsverfahren erschweren.

Einen Meilenstein stellt sicherlich die Arbeit von Townsend et al. (2008) dar, in der die Autoren gleich 26 neu etablierte Kerngene für die phylogenetische Analyse präsentieren. Dennoch sind universell verwendbare Primer für Vertebraten bzw. Squamaten die Ausnahme.

Die sich rasant entwickelnde Technik, wie Solexa und Roche-454, ermöglicht es mittlerweile, komplette Genome kostengünstig und schnell zu sequenzieren. Der allgemeine Trend in der Phylogenetik führt daher unvermeidlich von Kilobasen- zu Megabasen-Datensätzen (z.B. Regier et al. 2010).

Große Datensätze haben den Vorzug, dass Rückmutationen, die das phylogenetische Signal verschleiern, durch Übersetzung in Aminosäuresequenzen ausgeblendet werden können. Große zusammenhängende Genombereiche bieten zudem eine Reihe weiterer diagnostischer Merkmale (genome-level characters), wie „Rare-genomic-changes“ (Rokas & Holland 2000), „Chromosome-rearrangements“ (Müller et al. 2003), relative Anordnung von Genen (O'Brien et al. 1998), Indels (Murphy et al. 2007), Genduplikationen (Bowers et al. 2003) oder RNA-Sekundärstrukturen (Boore 1999), die zur Beweisführung phylogenetischer Hypothesen herangezogen werden können (vergl. auch Brito & Edwards 2009).

Auf unterstem taxonomischen Level werden häufig DNA-Fingerprint-Methoden eingesetzt, um geographische Strukturen zwischen Populationen oder nahe verwandten Arten aufzudecken. Sogenannte Microsatelliten (STRs, short tandem repeats) sind hochpolymorphe mendelische Marker, die in den späten 1980er Jahren entdeckt worden sind (z.B. Tautz 1989). Microsatelliten bestehen aus tandemartig aneinandergereihten Di-, Tri-, oder Tetranukleotiden, die im gesamten Kerngenom in unterschiedlicher Längenvariation vorkommen (Hamada et al. 1984). Die repetitiven Sequenzmotive evolvieren sehr schnell. Mutationsraten unterliegen jedoch einem starken „Bias“ und können innerhalb des Locus, zwischen Loci, zwischen Allelen und zwischen evolutionären Linien variieren. Homoplasien und genotypische Artefakte erschweren zudem ihre Analyse (Zink & Barrowclough 2008).

In der wissenschaftlichen Gemeinde gelten deshalb sequenzbasierte Marker mittlerweile den Microsatelliten als überlegen (Brito & Edwards 2009).

Multigen-Analysen gehören inzwischen zum Standard in der molekularen Phylogenetik. Bei der nunmehr großen Auswahl an Markern wird in der phylogenetischen Literatur auch die Frage diskutiert, ob sich Topologien von Stammbäumen durch zusätzliche Merkmale oder eher durch zusätzliche Taxa stabilisieren lassen (Philippe et al. 2004). In der Taxa-versus-Loci-Debatte betonen Jeffroy et al. (2006), dass die horizontale Datensammlung in keinem Fall unter Vernachlässigung der vertikalen ablaufen sollte. Die Hinzunahme eines weiteren

Genes für die phylogenetische Analyse führt per se nicht zu einem eindeutigeren phylogenetischen Signal. Im Gegenteil, das Erhöhen der Sequenzinformation kann die Präzision der Parameterabschätzung kritisch beeinflussen (Brito & Edwards 2009). Einem vollständigen Taxon-Sampling sollte daher grundsätzlich mehr Beachtung geschenkt werden.

Das experimentelle Design zur Rekonstruktion der Phylogenie und Phylogeographie eurasischer Vipern richtete ich auf eine sequenzbasierte Multigen-Analyse aus.

Drei unterschiedlich schnell evolvierende proteincodierende mt-Gene sollten Aufschluss über Speziationsprozesse und die Verwandtschaft der zu untersuchenden Taxa geben. Ausgewählt wurden erstens das langsam evolvierende Gen COX1, das erfolgreich zur biologischen Barcoding-Identifizierung von Spezies verwendet wird (Hebert et al. 2002), zweitens das schnell evolvierende Gen Cytb, das als Standardmarker in der Herpetologie häufig Verwendung findet (z.B. Lenk et al. 2001) und in großer Zahl als Referenzsequenz in den Gendatenbanken vorhanden ist. Die Wahl des dritten mt-Gens fiel auf das Gen ND5, das bei Schlangen sehr hohe Substitutionsraten aufweist (Jiang et al. 2007).

Zusätzlich verwendete ich biparental vererbte Kernmarker, die ein alternatives Abbild der evolutionären Geschichte zeichnen. Die Wahl fiel auf zwei proteincodierende Single-Copy-Gene. Rag1 wurde erfolgreich in allen Vertebratengruppen eingesetzt, unter anderem auch bei Reptilien (Townsend et al. 2004). Das zweite Kerngen Bach1 wurde erst 2008 als Marker publiziert. Vergleichsdaten liegen noch nicht vor.

Die dritte Säule bilden komplette Mitogenome repräsentativer Taxa, die gezielt nach gruppenspezifischen „Genome-level“-Charakteren durchsucht wurden. In einer Reihe von Publikationen konnte gezeigt werden, dass vollständige Mitogenome für die phylogenetische Rekonstruktion aussagekräftiger sind als Einzelgenvergleiche (z.B. Boore et al. 2004). Mit ihrer Hilfe sollten vor allem Divergenzzeiten der Viperinae berechnet werden.

#### **2.4.2.2 Primerdesign**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer (siehe Tabelle 3 und Tabelle 6) zur Amplifizierung und Sequenzierung wurden von mir spezifisch für die untersuchte Viperngruppe designt. Die Strategie zur Etablierung spezifischer Primer für die Amplifizierung der Markergene bestand aus zwei Schritten. Zunächst alignierte ich orthologe Genbanksequenzen (NCBI) nahe verwandter Taxa und durchsuchte diese nach

Tabelle 3: Auflistung, der von mir designten Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung der Mitochondriengene Cytb, COI und ND5. Angegeben sind der Name des Primers, dessen Verwendung zur Amplifizierung (Amp.) und/oder Sequenzierung (Seq.) des Zielgens sowie seine Bindungsposition im Referenz-Mitochondriengenom von *Montivipera xanthina*. Zusätzlich zur Nukleotidsequenz des Primers finden sich seine spezifische Schmelztemperatur (Tm) sowie seine gruppenspezifische Verwendung (Taxon). Aus dem Namen des Primers geht die Orientierung des Template Stranges der mt-DNA hervor (F=forward=light strand; R=reverse=heavy strand). Beispiel: der Primer F8\_Cytb ist ein forward Primer, der sich an den 5'-3' orientierten L-Strang des mt-Genoms bindet.

Primer Name	Verwendung	Position <sup>1)</sup>	Sequenz [5'---3']	Tm <sup>2)</sup> [°C]	Taxon
<b>Cytb</b>					
F1_Cytb	Amp./Seq.	14971	tgaggcctgaaaaaccaccgttg	61,1	<i>Montivipera, Macrovipera, Vipera</i>
F_Cytb_rs	Seq.	14985	ggcctgaaaaaccactgtgttatcaactaaa	61,0	<i>russelli</i>
F_Cytb_lb	Seq.	15073	caacctgatgaaactttggatcaacc	57,6	<i>lebetina</i>
F6_Cytb	Seq.	15281	gcacgaggccttactactcgggt	63,2	<i>ammodytes, latastei</i>
F4_Cytb	Seq.	15321	agtgtgactgtcaggcaccatcct	62,5	<i>xanthina, Ephesus</i>
F7_Cytb	Seq.	15372	ggytacgtctwccatgagg	54,7	<i>russelli, Pseudocerastes</i>
F5_Cytb	Seq.	15373	cggctatgtcctaccatgagga	58,8	<i>mauritanica</i>
F2_Cytb	Seq.	15376	gggtacgttttaccatggggccaa	60,7	<i>Montivipera, Macrovipera, Vipera</i>
F3_Cytb	Seq.	15376	gggtacgttttaccctgaggccag	60,7	<i>raddei</i>
F2_Cytb_pl	Seq.	15378	ttggctacgttttaccatgaggacagat	60,0	<i>palaestinae</i>
F8_Cytb	Seq.	15413	gcagcaacagtaatacacaacctcc	61,2	<i>kaznakovi, berus-Gruppe</i>
F2_Cytb_Em,Pf	Seq.	15498	atcaacgacccmacactcaccgatt	61,8	<i>Eristicophis, Pseudocerastes</i>
F2_Cytb_lb	Seq.	15622	aactccgacatcgacaaaatccca	59,1	<i>lebetina</i>
R_Cytb_lb	Seq.	16012	atgattgaggcaagttgtcctact	56,8	<i>lebetina</i>
RA_Cytb	Seq.	16099	aggacgatgctttaggttttaagctactggagcag	65,1	<i>Montivipera, Macrovipera</i>
R_Cytb_rs	Seq.	16113	agctactagagcaggaatagttggagat	58,6	<i>russelli</i>
RB_Cytb	Amp./Seq.	16125	ccatcttcgatttacaaggacgatgc	58,8	<i>Montivipera, Macrovipera, Vipera</i>
<b>COI</b>					
F1_COI	Amp./Seq.	6246	acagtttaccgctttaacagcca	57,6	<i>Viperinae</i>
F_COI_lb	Seq.	6259	accgctttaatcagccatactacctgtgtc	61,9	<i>lebetina</i>
F3_COI_Pf,Em,Cc,Ba	Seq.	6673	ggaacacctcgtccactcagg	58,7	<i>Pseudocerastes, Eristicophis, Cerastes, Bitis</i>
F3_COI_Mtv	Seq.	6673	ggtaacctagtctactcagg	53,2	<i>xanthina, raddei, latifii, bornmuelleri</i>
F3_COI_wg,az,bg	Seq.	6673	aggtaacctgttctactcgg	57,5	<i>wagneri, albizona, bulgardaghica</i>
F3_COI_Dab	Seq.	6685	cactcaggcccatcagtaga	57,1	<i>Daboia</i>
F3_COI_Vip	Seq.	6688	cactcagggccatcagtagacct	60,9	<i>Vipera</i>
F3_COI_Mcv	Seq.	6726	acctgcccggagcctcatcta	60,9	<i>Macrovipera</i>
R_COI_lb	Seq.	7160	attgtagctgctgtaagtaggca	57,0	<i>lebetina</i>
R1_COI	Amp./Seq.	7852	ataggtggcagtttaagtctgtctc	57,0	<i>Viperinae</i>
<b>ND5</b>					
F1_ND5	Amp./Seq.	12517	acaccgagaggtcaagaagacctgc	62,8	<i>Viperinae, nicht Vipera</i>
R1_ND5	Amp./Seq.	13267	qaattgtgctgatttctacagct	56,7	<i>Viperinae, nicht Vipera</i>

<sup>1)</sup> letzte Nukleotidposition des Primers in 3' Richtung im Referenz-Mitochondrien-Genom von *Montivipera xanthina* mit 17198 bp. <sup>2)</sup> Schmelztemperatur (Tm) nach Allawi & SantaLucia (1997).

konservierten Regionen, die das Markergen in 5' und 3' Richtung einschlossen. Mithilfe degenerierter Primer war es nun möglich, die flankierenden Regionen der Markergene zu amplifizieren und zu sequenzieren. War die Nukleotidsequenz repräsentativer Taxa bekannt, gelang es so, gruppenspezifische Primer für die Routine PCR der Markergene zu konstruieren.

Mit der gleichen Methode etablierte ich die Primer für die long-range PCR. Als Referenz dienten die kompletten mt-Genome von *Ovophis okinavensis* (gi 74487323), *Python regius* (gi 74310572) und *Xenopeltis unicolor* (gi 74310600).

Die Primer-Sequenzen generierte ich mit dem Computerprogramm FastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>). Das Programm ermöglicht eine Evaluierung der Sequenzen durch diverse Qualitätstests und gewährleistet so eine hohe Effizienz bei der PCR. Die Länge der Oligos wurde auf 18 bis 35 Nukleotide beschränkt und die Schmelztemperatur der Primerpaare auf  $60^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  synchronisiert. Die Schmelztemperatur wurde nach Allawi & SantaLucia (1997) berechnet. Alle Primer wurden einer Loop- und Dimeranalyse unterzogen. Ich war bestrebt, Hybridisierungsregionen mit hoher "linguistischer Komplexität" auszuwählen, die sich durch geeignete Nukleotid-Arrangements (degenerierte Aminosäuren, Polypyrimidin und Polypurin stretches, Homopolymere) und Komposition (Verhältnis von GC zu AT) auszeichneten. Die verwendeten Primer haben eine hohe Komplementarität zur Template insbesondere zum 3'-Ende.

#### 2.4.2.3 Amplifizierung proteincodierender mt-Gene

Drei proteincodierende mt-Gene, Cytochrom b (Cytb), Cytochrom c Oxidase1 (CO1/COX1) und NADH Dehydrogenase 5 (ND5/NAD5), vervielfältigte ich selektiv über die Polymerasekettenreaktion (PCR).

Für die Amplifizierung von Fragmenten <3 kb verwendete ich eine thermostabile Polymerase mit 3' => 5' Exonuclease-Aktivität von TaKaRa (Ex Taq™ DNA Polymerase). Die proofreading-Aktivität (Korrektur-Lesefunktion) verhindert Fehler bei der Polymerisation. Sie erkennt und entfernt unpassende Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTPs) aus dem neu synthetisierten komplementären DNA-Strang.

Alle DNA-Polymerasen machen während der Synthese Fehler. Der Typ und die Rate der Fehler ist abhängig von der verwendeten Polymerase und den Reaktionsbedingungen (z.B. Goodman et al. 1974, Keohavong et al. 1993). PCR-generierte Mutationen treten nach Schätzungen alle 9000 Nukleotide auf. Da bei der PCR wiederholt Kopien von Kopien entstehen, sammelt sich der "PCR-noise" von Zyklus zu Zyklus an.

Das verwendete Ex-Taq™-Polymerase-System ist effektiver und hat eine 4,5fach niedrigere Mutationsrate (nach der Kunkel Methode) als Standard-Taq-DNA-Polymerase.

Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden schrittweise empirisch optimiert sowie die Qualität und Quantität der PCR-Produkte über Agarosegelelektrophorese bestimmt. Zunächst wurde in einem Temperaturgradienten die Annealingtemperatur mit dem stärksten

und spezifischsten Produkt ermittelt, anschließend wurden die Elongation- und Annealingzeiten optimiert. Die Reaktionsbedingungen entsprechen dem typischen periodischen Temperaturprofil mit drei Reaktionsstufen. Unterschiede bei den Reaktionsbedingungen ergeben sich aus den unterschiedlichen Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der Primer und der Länge des synthetisierten Amplikons. Tabelle 4 zeigt die gewählten PCR-Temperaturprofile für die drei mt-Gene Cytb, COX1 und ND5 im Detail.

Angesetzt wurde die PCR unter der Sterilbank in 25  $\mu$ l Reaktionsvolumen mit 0,125  $\mu$ l Ex-Taq, 2,5  $\mu$ l 10x Ex-Taq-buffer, 2  $\mu$ l dNTP Mixture, 1  $\mu$ l Template, 0,5  $\mu$ l L-Primer, 0,5  $\mu$ l H-Primer (je 10 pmol) und 18,4  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O.

Die PCR-Zyklen wurden in einem vollautomatischen Thermocycler mit Heizdeckel (Eppendorf Mastercycler Gradient) in 0,5 ml Eppendorf-Tubes durchgeführt. Im Anschluss wurden die Ethidiumbromid-gefärbten Amplikons über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch UV-Licht sichtbar gemacht.

#### 2.4.2.4 Amplifizierung vollständiger mt-Genome mit Hilfe der long and accurate PCR

Neun Mitochondrien-Genome vervielfältigte ich selektiv aus genomischer DNA über die Polymerasekettenreaktion (PCR), eine bewährte und viel genutzte Strategie (Boore et al. 2005). Die DNA für die LA-PCR wurde von frisch totem oder tiefgefrorenem, nicht konservierten Material gewonnen.

Das erste mt-Genom von *Montivipera wagneri* amplifizierte ich in zwei sich überlappenden Fragmenten mit 4867 bp (Fx9-Rx14) und 14593 bp (F3\_LA-R3\_LA) (siehe Tabelle 5 und Abbildung 2, linke Seite). Alle weiteren 8 mt-Genome von *Vipera orlovi*, *V. berus bosniensis*, *V. ammodytes ammodytes*, *Montivipera xanthina*, *Montivipera raddei kurdistanica*, *Macrovipera lebetina obtusa*, *Macrovipera lebetina turanica* und *Daboia mauritanica* wurden in drei sich überlappenden Fragmenten mit 6489 bp (Fx9-R1\_COI), 5910 bp (F3\_COI-R6LA) und 6602 bp (Fx33-Rx3) amplifiziert (siehe Tabelle 5 und Abbildung 2, rechte Seite). Für die PCR wurde eine speziell für die Synthese großer Fragmente (>15 kb) entwickelte long and accurate polymerase (LA Taq™) von TaKaRa Bio Inc. benutzt (siehe Tabelle 5). Bei dem Enzym handelt es sich um eine thermostabile Polymerase mit gesteigerter Fidelity durch 3' → 5' Exonuclease Aktivität (proof reading activity). Ihre Mutationsrate ist um das 6,5-fache geringer als die herkömmlicher Polymerase.

Die long and accurate PCR (LA-PCR) ist wesentlich störungsanfälliger als die Standard-PCR. Ihrer erfolgreichen Etablierung gingen eine Reihe von Tests sowie Feinabstimmungen der Reaktionsbedingungen voraus.

Um unspezifische Amplifikation zu vermeiden, empfiehlt der Hersteller einen "Cool start" der

Tabelle 4: Verwendete Temperaturprofile der Polymerasekettenreaktion (PCR) für die mt-Gene Cytb, COX1 und ND5. Zu Beginn der PCR steht eine einmalige Denaturierung, in deren Anschluss der zyklische, dreistufige Temperaturverlauf mit Denaturierung, Annealing und Elongation folgt. Nach 35 Zyklen verlängert man die Polymerisation um mehrere Minuten und kühlt auf 8 °C ab.

<p>Cytb (ca. 1159 nt)</p> <p>Initiale Denaturierung 95°C, 2 Min.</p> <p>gefolgt von 35 Zyklen:</p> <p>94 °C, 40 Sek. [Denaturierung]</p> <p>60 °C, 40 Sek. [Annealing]</p> <p>72 °C, 1,1 Min. [Elongation]</p> <p>Ende Zyklen</p> <p>Finale Elongation bei 72 °C, 5 Min. und Abkühlung auf 8 °C</p>	<p>COI (ca. 1605 nt)</p> <p>Initiale Denaturierung 95°C, 2 Min.</p> <p>gefolgt von 35 Zyklen:</p> <p>94 °C, 45 Sek. [Denaturierung]</p> <p>57 °C, 45 Sek. [Annealing]</p> <p>72 °C, 2 Min. [Elongation]</p> <p>Ende Zyklen</p> <p>Finale Elongation bei 72 °C, 5 Min. und Abkühlung auf 8 °C</p>	<p>ND5 (ca. 749 nt)</p> <p>Initiale Denaturierung 95°C, 2 Min.</p> <p>gefolgt von 35 Zyklen:</p> <p>94 °C, 45 Sek. [Denaturierung]</p> <p>60 °C, 45 Sek. [Annealing]</p> <p>72 °C, 1 Min. [Elongation]</p> <p>Ende Zyklen</p> <p>Finale Elongation bei 72 °C, 5 Min. und Abkühlung auf 8 °C</p>
---	--	---

Tabelle 5: Reaktionsansatz und Programmeinstellungen der LA-PCR (Eppendorf Master Cycler Gradient) im Überblick. Elongationszeit und Annealingtemperatur wurden der Größe des Amplikons und den verwendeten Primern angepasst. Der Richtwert der Elongationszeit beträgt 1 kb/Min. Die Annealingtemperatur richtet sich nach dem Primer mit der jeweils niedrigeren Schmelztemperatur [T<sub>m</sub>].

<p>50 µl Reaktionsansatz</p> <p>0,5 µl TaKaRa LA Taq (5U / µl), 5 µl 10x LA PCR buffer (Mg<sup>2+</sup> free), 5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (final 2,5 mM), 8 µl dNTP Mix (je 2,5 mM), 2-5 µl Template, 1 µl L-Primer, 1 µl H-Primer (je 10 pmol) und 24,5-28,5 µl dH<sub>2</sub>O.</p>
<p>F3_LA-R3_LA, 14593 nt</p> <p>Hot start: 1: 95 °C, 3 Min. / 2: Pause - Zugabe von Mastermix / 3: 94 °C, 20 Sek. / 4: 62 °C, 40 Sek. / 5: 68 °C, 14 Min. / 6: go to 3, repeat 14 Cycles / 7: 94 °C, 20 Sek. / 8: 62 °C, 40 Sek. / 9: 68 °C, 14 Min. + increment 15 Sek. / 10: go to 7, repeat 20 Cycles / 11: 72°C, 10 Min. / 12: hold at 10°C.</p> <p>Fx9-Rx14, 4867 nt</p> <p>Hot start: 1: 95 °C, 3 Min. / 2: Pause - Zugabe von Mastermix / 3: 94 °C, 20 Sek. / 4: 58,8 °C, 40 Sek. / 5: 68 °C, 8 Min. / 6: go to 3, repeat 14 Cycles / 7: 94 °C, 20 Sek. / 8: 58,8 °C, 40 Sek. / 9: 68 °C, 8 Min. + increment 15 Sek. / 10: go to 7, repeat 20 Cycles / 11: 72°C, 10 Min. / 12: hold at 10°C.</p> <p>Fx9-R1_COI, 6489 nt</p> <p>Hot start: 1: 95 °C, 3 Min. / 2: Pause - Zugabe von Mastermix / 3: 94 °C, 20 Sek. / 4: 61 °C, 35 Sek. / 5: 68 °C, 7,5 Min. / 6: go to 3, repeat 14 Cycles / 7: 94 °C, 20 Sek. / 8: 60 °C, 30 Sek. / 9: 68 °C, 14 Min. + increment 15 Sek. / 10: go to 7, repeat 20 Cycles / 11: 72°C, 10 Min. / 12: hold at 10°C.</p> <p>F3_COI-R6LA, 5910 nt</p> <p>Hot start: 1: 95 °C, 3 Min. / 2: Pause - Zugabe von Mastermix / 3: 94 °C, 20 Sek. / 4: 60 °C, 30 Sek. / 5: 68 °C, 7,3 Min. / 6: go to 3, repeat 14 Cycles / 7: 94 °C, 20 Sek. / 8: 60 °C, 30 Sek. / 9: 68 °C, 7,3 Min. + increment 15 Sek. / 10: go to 7, repeat 20 Cycles / 11: 72°C, 10 Min. / 12: hold at 10°C.</p> <p>Fx33-Rx3, 6602 nt</p> <p>Hot start: 1: 95 °C, 3 Min. / 2: Pause - Zugabe von Mastermix / 3: 94 °C, 20 Sek. / 4: 55 °C, 40 Sek. / 5: 68 °C, 9 Min. / 6: go to 3, repeat 14 Cycles / 7: 94 °C, 20 Sek. / 8: 55 °C, 40 Sek. / 9: 68 °C, 9 Min. + increment 15 Sek. / 10: go to 7, repeat 20 Cycles / 11: 72°C, 10 Min. / 12: hold at 10°C.</p>



LA-PCR. Nach diversen Tests mit verschiedenen Proben und Primerkombinationen zeigte sich jedoch, dass die Performance der Reaktion durch manuelle "Hot-starts" deutlich verbessert werden konnte. Das Temperaturprofil der Reaktion richtete sich nach den von Boore et al. (2005) publizierten Werten.

Der Reaktionsansatz wurde in zwei separaten 0,5 ml Eppendorf-Tubes unter der Sterilbank vorbereitet. In einem Tube wurden Wasser (dH<sub>2</sub>O) und Template vereint, in dem zweiten Tube wurde ein Mastermix aus Puffer, Primer und dNTPs vorbereitet. Die Template wurde dann für 3 Min. bei 95 °C in einem vorgeheizten Thermocycler (Eppendorf-Mastercycler-Gradient) denaturiert. Nach Ablauf der 3 Min. wurde der zuvor kurz erhitze Mastermix zur Template pipettiert. Bei diesem Schritt ist unbedingt auf zügige Durchführung zu achten, um

Tabelle 6: Auflistung der von mir designten Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung vollständiger mt-Genome von *Vipera orlovi*, *Vipera berus bosniensis*, *V. ammodytes ammodytes*, *Montivipera wagneri*, *M. xanthina*, *M. raddei*, *Macrovipera lebetina obtusa*, *M. lebetina turanica* und *Daboia mauritanica*. Angegeben sind der Name des Primers, dessen Verwendung zur Amplifizierung (Amp.) und/oder Sequenzierung (Seq.) des Amplikons sowie seine Bindungsposition im Referenz-Mitochondriengenom von *Montivipera xanthina* (siehe Abbildung 1). Zusätzlich zur Nukleotidsequenz des Primers finden sich seine spezifische Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) sowie seine gruppenspezifische Verwendung (Taxon). Anmerkungen zu <sup>1,2)</sup> siehe Legende auf der nächsten Seite.

Primer Name	Verwendung	Position <sup>1)</sup>	Sequenz [5'---3']	T <sub>m</sub> <sup>2)</sup> [°C]	Taxon
Fx13	Seq.	252	ttaggcataagtgaacttgacc	56,2	<i>Ovophis, wagneri</i>
R2_LA	Seq.	286	tgtaaccgcggtcgctggca	64,6	Viperinae
Rx2	Seq.	579	ggttattggacaggctcctcta	56,8	Viperinae
Fx16b	Seq.	654	gccaacagctctatataccRccgtc	56,3	Viperinae
Fx2	Seq.	870	tgaagtgcgtacacaccgc	59,0	Viperinae
Fx9	Amp./Seq.	1363	cggagatagctggctacccc	60,6	<i>Ovophis, wagneri</i>
Rx3	Amp./Seq.	1884	ttgcacggttaggataccgc	58,5	Viperinae
F2_LA	Seq.	1906	ccgcggatcctaaccgtgcaaagg	64,5	Viperinae
Rx13	Seq.	2085	gttccaaagtcgccccaacgaa	64,7	Viperinae, nicht <i>mauritanica</i>
R3_LA	Seq.	2246	tgtctgatccaacatcgaggctgtaaacc	63,2	Serpentes
Fx3	Seq.	2267	ggttacgacctgatgttga	57,7	Viperinae
Fx29	Seq.	2588	acccattcttcgcagtagcct	58,6	Viperinae
Rx24	Seq.	3108	ggttacatcaaccctagcaga	55,5	<i>wagneri, Ovophis</i>
Fx30	Seq.	3131	accaaccgatcaccatttgacc	58,7	<i>Viperinae, nicht xanthina</i>
Fx25	Seq.	3492	ccacaatggaagcgtgcctg	60,6	Viperinae
Rx24	Seq.	4677	ttgcatggccgcgcttggct	64,4	<i>Ovophis, Viperinae</i>
R4_LA	Seq.	4831	cattttcggggtatggcccgatagc	64,3	Viperinae
F3_LA	Seq.	4852	aagctatcgggccataccccgaa	64,4	Viperinae
Rx20	Seq.	4935	agtcagtggtgtgctgtggt	57,7	<i>wagneri, xanthina</i>
Rx27	Seq.	5188	aagtggaaatggtgcgcagctat	61,9	Viperinae
Fx27b	Seq.	5287	acctgacaaaaaattgcccc	55,5	Viperinae
Rx5	Seq.	5643	tcattttggtatgaaccgggtgag	58,1	Viperinae
Fx8	Seq.	6055	agaccagtaggcctcgatcct	59,8	Viperinae
Fx28	Seq.	6060	aggcctcgatctacaaa	53,9	Viperinae
Rx14	Seq.	6230	ggtagtatggctgattaaagcggt	57,6	Viperinae
F1_COI	Seq.	6246	acagttaccgctttaatcagcca	57,6	Viperidae
F3_COI_wg,az,bg	Amp./Seq.	6673	aggtaacctggtcactcgg	57,5	<i>wagneri, albizona, bulgardaghica</i>
F3_COI_Mtv	Amp./Seq.	6673	ggtaacctagttcactcagg	53,2	<i>xanthina, raddei, latifii, bommuelleri</i>
F3_COI_Dab	Amp./Seq.	6685	cactcaggccatcagtaga	57,1	<i>Daboia</i>
F3_COI_Vip	Amp./Seq.	6688	cactcaggccatcagtagacct	60,9	<i>Vipera</i>
F3_COI_Mcv	Amp./Seq.	6726	accttgcggagcctcatcta	60,9	<i>Macrovipera</i>
Fx31	Seq.	7174	agccgtgcctactttacagc	58,5	Viperinae
Fx32	Seq.	7578	atcnggcacrcchcgtcgwtactcag	64,6	Viperinae
R1_COI	Amp./Seq.	7852	atagggtgcagttaaagtcgtctc	57,0	Viperidae
Fx17b	Seq.	7875	gagacagactttaactgccaccta	57,0	Viperinae
Fx19b	Seq.	8438	caggyctrcaaacccgaattgt	54,6	Viperinae
Fx21_lb	Seq.	8917	tgaacaattcataagccaga	53,0	<i>orlovi</i>

Fortsetzung Tabelle 6: Auflistung der von mir designten Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung vollständiger mt-Genome von *Vipera orlovi*, *Vipera berus bosniensis*, *V. ammodytes ammodytes*, *Montivipera wagneri*, *M. xanthina*, *M. raddei*, *Macrovipera lebetina obtusa*, *M. lebetina turanica* und *Daboia mauritanica*. Angegeben sind der Name des Primers, dessen Verwendung zur Amplifizierung (Amp.) und/oder Sequenzierung (Seq.) des Amplikons sowie seine Bindungsposition im Referenz Mitochondrien-Genom von *Montivipera xanthina* (siehe Abbildung 1). Zusätzlich zur Nukleotidsequenz des Primers findet sich seine spezifische Schmelztemperatur (Tm) sowie seine gruppenspezifische Verwendung (Taxon).

Primer Name	Verwendung	Position <sup>1)</sup>	Sequenz [5'---3']	Tm <sup>2)</sup> [°C]	Taxon
Fx21_mr,v,rr,xt	Seq.	8917	ttgaacagtttttaagcccaga	53,7	<i>mauritanica</i> , <i>Vipera</i> , <i>raddei</i> , <i>xanthina</i>
Fx22	Seq.	9365	ggcgtacgacttacagccc	56,9	Viperinae
Fx22b	Seq.	9370	gcgtacgacttacagtaacat	55,6	<i>bosniensis</i>
Rx19b	Seq.	10272	tctacgaagtgtcartatcarattgc	54,5	Viperinae
Rx18	Seq.	10777	gggctataaaataagtcttttgagtcg	55,1	<i>Ovophis</i> , <i>wagneri</i>
Rx31	Seq.	11336	cgtgtcgttgragggytcttta	56,9	Viperinae
Rx30	Seq.	11715	acgtgggttggggagtcga	62,1	Viperinae
Rx29	Seq.	12071	agatrcgggttrttrcgttcgtag	62,5	Viperinae
Fx33	Amp./Seq.	12480	tatcaagctgtgaccctgaaat	55,2	Viperinae
F1_ND5	Seq.	12517	acaccgagaggtcaagaagacctgc	62,8	Viperidae, nicht <i>Vipera</i>
R6_LA	Amp./Seq.	12583	cttgatttgcaccaagaagtgttgcttaagac	64,3	Serpentes
ND5_F_am	Seq.	12918	gcactgttcacatgtrccattactga	58,9	<i>ammodytes</i>
ND5_F2_ds	Seq.	12931	tggctattaccgaatacttacttga	57,3	Viperinae, nicht <i>Vipera</i>
Fx6	Seq.	13050	ccaactcttattggctgagaggg	58,6	Viperinae
R1_ND5	Seq.	13267	gaattgtgctgatttctacagct	56,7	Viperidae, nicht <i>Vipera</i>
ND5_F_Vip	Seq.	13297	aaatcmgcacaattcagcct	52,3	Viperinae
ND5_R_rs	Seq.	13349	actatggtgctgagtgag	55,4	<i>russelli</i>
Rx32V	Seq.	13529	aggcctagttrctgttggtgatagtc	61,2	<i>Vipera</i>
Rx32M	Seq.	13541	taggcctagtggctgt	54,3	<i>Montivipera</i> , <i>Macrovipera</i>
Fx36	Seq.	13543	gcactatcmaccacaagyaactaggg	58,4	<i>Daboia</i>
Fx34V	Seq.	13819	attgagaccataaacaactcccat	55,1	<i>Vipera</i>
Fx34mr	Seq.	13843	aacaaactcccatgtaaatcatgagct	57,6	<i>mauritanica</i>
Fx34M	Seq.	13876	acagccctatccgcctcttat	58,1	<i>Montivipera</i> , <i>Macrovipera</i>
Fx10	Seq.	14155	taccccccaaaaaaccacaaaca	60,2	<i>Ovophis</i> , <i>wagneri</i>
Fx35xte	Seq.	14252	aaatccgccaacaactctcaacag	60,5	<i>xanthina</i>
Fx35lb	Seq.	14252	atctgcccaacaatgtcaacag	57,2	<i>lebetina</i>
Fx35orl	Seq.	14256	tctgttcaacaagtatccacagaac	57,4	<i>orlovi</i>
Fx35M	Seq.	14305	aattacggrcctaarggyctctcyaaaacc	63,9	<i>Montivipera</i> , <i>Macrovipera</i>
Fx35V	Seq.	14309	atggrccyaarggcctctctaa	53,7	<i>Vipera</i>
F1_Cytb	Seq.	14971	tgaggctgaaaaaccacgggtg	61,1	<i>Montivipera</i> , <i>Macrovipera</i> , <i>Vipera</i>
Cytb_RD	Seq.	15167	tgggacatctcgggtatgtg	58,4	Viperinae
F6_Cytb	Seq.	15281	gcacgaggcctctactacgggt	63,2	<i>ammodytes</i> , <i>latastei</i>
F4_Cytb	Seq.	15321	agtgtgactgtcaggcaccatcct	62,5	<i>xanthina</i> , Ephesus
F5_Cytb	Seq.	15373	cggctatgtctaccatgagga	58,8	<i>mauritanica</i>
F2_Cytb	Seq.	15376	ggttacgttttaccatggggccaa	60,7	<i>Montivipera</i> , <i>Macrovipera</i>
Fx1	Seq.	15990	ttacctgagcagccacaaaacc	58,9	Viperinae
RB_Cytb	Seq.	16125	ccatcttcgatttacaaggacgatgc	58,8	<i>Montivipera</i> , <i>Macrovipera</i> , <i>Vipera</i>
Rx25	Seq.	16393	caacctctgttaaatggaacgacc	57,1	<i>Ovophis</i> , <i>wagneri</i>
Fx26	Seq.	16464	tcaaacgggtgtccatga	57,4	<i>wagneri</i> , <i>Ovophis</i>
Rx28	Seq.	16560	tgttaaccagcggccttgaa	60,1	Viperinae
Rx23	Seq.	16735	cggtaacgagcatatatgggtgtcag	59,7	<i>Ovophis</i> , <i>wagneri</i>

<sup>1)</sup> letzte Nukleotidposition des Primers in 3' Richtung im Referenz Mitochondrien Genom von *Montivipera xanthina* mit 17198 bp. <sup>2)</sup> Schmelztemperatur (Tm) nach Allawi & SantaLucia (1997)

unnötige Verdampfung zu vermeiden. Nach der Vereinigung des Reaktionsansatzes folgten 15 Zyklen mit einer weiteren Denaturierung für 20 Sek. bei 94 °C, Annealing für 40 Sek. bei 62 °C und Elongation für 14 Min. bei 68 °C. Die Elongationszeit richtet sich nach der Größe des Amplikons (Richtwert 1kb/min). Mit fortschreitender Zykluszahl reduziert sich die Prozessivität und die Polymerisierungsrate des Enzyms fällt ab. Ein zusätzliches Zeitinkrement von 15 Sek. pro Elongationszyklus gewährleistet die vollständige Synthese

des DNA-Stranges vor der Dissoziation der Polymerase von der Template. Es folgten 20 Zyklen mit 94 °C Denaturierung für 20 Sek., 40 Sek. Annealing bei 62 °C und eine Elongation bei 68°C für 14 Min. mit 15 Sek. Zeitinkrement pro Zyklus. Abschließend wurde für 10 Min. bei 72 °C elongiert und auf 10 °C abgekühlt. Amplikons wurden in einem 0,8%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt und anschließend durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht. Die synthetisierten Amplikons dienen direkt als Matrize für die Cycle-Sequencing-Reaktion.

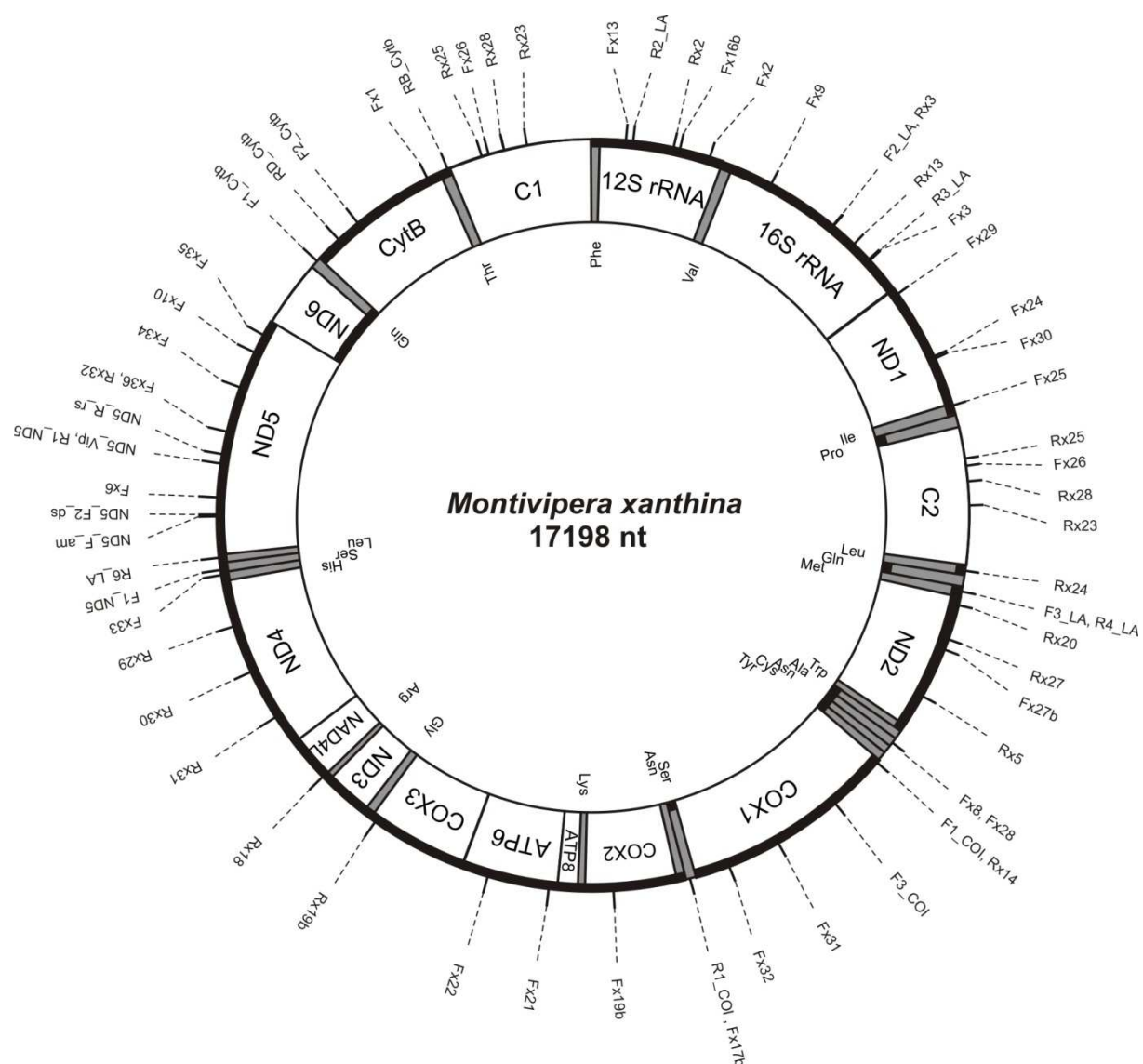


Abbildung 1: Graphische Übersicht zur Position der Primer aus Tabelle 3 und Tabelle 6, dargestellt im annotierten Referenz-mt-Genom von *Montivipera xanthina* (Original). Zu beachten ist die für Schlangen (Serpentes) charakteristische Verdopplung der Kontrollregion C1, C2. Aufgrund der Sequenzhomologie (Paralogie der Kontrollregion) binden Primer, deren komplementäre DNA-Matrize im Bereich der Kontrollregionen liegt, immer an beiden paralogenen Genen.



Abbildung 2: Vorgehensweise zur Amplifizierung ganzer mt-Genome. Die Abbildungen zeigen Lage und Größe der sich überlappenden long-range PCR-Fragmente sowie die Positionen der paralogen Kontrollregion (C1, C2) im Referenz-Genom von *Montivipera xanthina* (Original). Linke Seite: In einem ersten Schritt wurde das mt-Genom von *Montivipera wagneri* in zwei Fragmenten mit 4867 bp (Fx9-Rx14) und 14593 bp (F3\_LA-R3\_LA) amplifiziert. Rechte Seite: Alle weiteren mt-Genome von *Vipera orlovi*, *V. berus bosniensis*, *V. ammodytes ammodytes*, *Montivipera xanthina*, *M. raddei kurdistanica*, *Macrovipera l. obtusa*, *M. l. turanica* und *Daboia mauritanica* wurden in drei Fragmenten mit 6489 bp (Fx9-R1\_COI), 5910 bp (F3\_COI-R6LA) und 6602 bp (Fx33-Rx3) amplifiziert. Die long-range PCR-Produkte wurden direkt als Template zur Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Reaktion eingesetzt.

#### 2.4.2.5 Amplifizierung von Kerngenen

Die Verfügbarkeit publizierter proteincodierender Kerngene für die phylogenetische Stammbaumrekonstruktion bei Squamaten ist überschaubar, obgleich in jüngster Vergangenheit eine Reihe neuer Marker publiziert wurden (Townsend et al. 2008). Die Entwicklung nuklearer Marker ist historisch bedingt ungleich schwieriger als die von mitochondrialen Markern (siehe Kapitel 2.4.2.1. Auswahl der Markergene).

Eine probate Vorgehensweise auf der Suche nach Kerngen-Primern für die zu untersuchende Organismengruppe ist es, publizierte Primer auszuprobieren. Universell verwendbare Kerngen-Primer für Squamaten sind jedoch die Ausnahme. Aus Mangel an Alternativen sind die am häufigsten verwendeten Loci bei Squamaten Rag1 und *c-mos* (Townsend et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden acht Kerngen-Primer getestet (siehe Tabelle 7), die bereits erfolgreich für Squamaten-Phylogenien genutzt wurden (Fujita et al. 2004, Jackman et al. 2008, Townsend et al. 2008). Dennoch konnten die Loci bei Viperiden nicht amplifiziert werden. Die Amplifikate waren durch multiple Banden oder Schmier so unspezifisch, dass sie sich für die Sequenzierung nicht eigneten. Es gelang lediglich bei einem Taxon, das Gen *Bach1* zu sequenzieren. Mit dessen Hilfe konnten dann zur Referenzsequenz von *Gallus gallus* degenerierte Primer entwickelt werden (Tabelle 8).

Für die neue Etablierung von Markergenen wurden homologe BLAST-Referenzsequenzen (z.B. *Gallus gallus*, *Bos taurus*) bekannter Gene aligniert und nach konservierten Bereichen

Tabelle 7: Übersicht zu den getesteten Kerngenen, mit Angaben zur Qualität und Quantität der Amplikons, Quelle, Gruppenspezifität und Fragmentlänge. D=Doppelbanden, H=heterogene Produkte, S=Schmier, 0=kein Amplikon, Q=Quantität Amplikon (+ stark, +- mittel, - schwach)

Gen	Amplikon					Autor	Organismen-Gruppe	Fragment-Länge [nt]
	D	H	S	0	Q			
R35	X	X			+-	Fujita et al. (2004)	Schildkröten	1280
Phosducin	X	X			-	Jackman et al. (2008)	Geckos	?
IRBP	X	X			-	unpubliziert		1210
PA2	X	X			+	unpubliziert		2000
SOX9	X	X			+	unpubliziert		1200
ZFX	X	X		X	-	unpubliziert		1280
ZFY				X		unpubliziert		2200
Akap 9	X	X	X		-	Townsend et al. (2008)	Squamata	1300
Bach1	X				+	Townsend et al. (2008)	Squamata	1500
FSHR			X	X		Townsend et al. (2008)	Squamata	753
PRLR	X		X		-	Townsend et al. (2008)	Squamata	532
PTPN12	X		X		-	Townsend et al. (2008)	Squamata	758
UBN1	X		X		-	Townsend et al. (2008)	Squamata	700

Tabelle 8: Verwendete Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung der Kerngene *Bach1* und *Rag1*. Angegeben sind der Name des Primers, dessen Verwendung zur Amplifizierung (Amp.) und/oder Sequenzierung (Seq.) des Amplikons, Nukleotidsequenz, spezifische Schmelztemperatur (Tm) und Quelle (Autor).

Primer Name	Verwendung	Sequenz [5'--3']	Tm <sup>2)</sup> [°C]	Autor
F1_BACH1	Amp.	gattgahccyttrcttcagttgc	52,8	Townsend 2008
R1_BACH1	Amp.	acctcacattcygttcyctrgc	53,7	Townsend 2008
F_Nik_Bach1	Amp./Seq.	acaatgtggctgacgtttgca	58,9	unpubliziert
R_Nik_Bach1	Amp./Seq.	cacacacgaatacggacattgctcg	60,9	unpubliziert
Rag1_F1	Amp./Seq.	agcacctctgtcgcactctgtggag	63,3	unpubliziert
Rag1_F2	Seq.	ctgtaagcagatccacctcagt	57,2	unpubliziert
Rag1_F3	Seq.	agctcaagtgaagattttgca	54,6	unpubliziert
Rag1_F4	Seq.	ggaatacaacagctctgtggatgac	56,5	unpubliziert
Rag1_F5	Seq.	gtgatgccactgcctagaagc	61,2	unpubliziert
Rag1_R1	Amp./Seq.	actgcccaggcaccaatggaacc	65,0	unpubliziert

<sup>2)</sup> Schmelztemperatur (Tm) nach Allawi & SantaLucia (1997)

bekannter Gene gesucht, die sich als Hybridisierungsregion für Primer eignen. Sequenzen des proteincodierenden Transkriptions-Faktors SOX-9 erwiesen sich als zu wenig variabel für die phylogenetische Analyse und das Gen Phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) konnte nicht taxonübergreifend amplifiziert werden. Je weniger Referenzsequenzen zur Verfügung standen, desto schwieriger wurde es, die Markergene durch PCR zu vervielfältigen. Das wurde insbesondere bei den Genen IRBP (interphotoreceptor retinoid-binding protein), ZFX und ZFY (X-linked zinc finger protein, Y-linked zinc finger protein) deutlich. Entsprechende Orthologe konnten im Viperidengenom nicht amplifiziert werden.

Anders war die Situation bei Rag-1 (recombination activating gene-1), für das bereits eine Reihe von Referenzsequenzen auch nahe verwandter Taxa in den Datenbanken hinterlegt sind (Townsend et al. 2004).

Mit den von mir neu designten Primern (Tabelle 8) gelang es, Fragmente der beiden Kerngene Bach1 und Rag1 taxonübergreifend zu amplifizieren (siehe Tabelle 9).

Angesetzt wurde die PCR unter der Sterilbank in 25 µl Reaktionsvolumen mit 0,125 µl Ex Taq, 2,5 µl 10x Ex Taq buffer, 2 µl dNTP Mixture, 1µl Template, 0,5 µl L-Primer, 0,5 µl H-Primer (je 10 pmol) und 18,4 µl dH<sub>2</sub>O.

Die PCR-Zyklen wurden in einem vollautomatischen Thermocycler mit Heizdeckel (Eppendorf Mastercycler Gradient) in 0,5 ml Eppendorf-Tubes durchgeführt. Im Anschluss wurden die Ethidiumbromid gefärbten Amplikons über die Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht.

Für große PCR-Fragmente, die nicht vollständig mit den 5' und 3' PCR-Primern sequenziert werden konnten, mussten interne Sequenzierprimer in stufenweisem Abstand von 400 bis 500 Nukleotiden designt werden.

Tabelle 9: Verwendete Temperaturprofile der Polymerasekettenreaktion (PCR) für die Kerngene Rag1 und Bach1. Zu Beginn der PCR steht eine einmalige Denaturierung, in dessen Anschluss der zyklische dreistufige Temperaturverlauf mit Denaturierung, Annealing und Elongation folgt. Nach 35 Zyklen verlängert man die Polymerisation um mehrere Minuten und kühlt auf 8 °C ab.

<p><b><u>Rag1</u></b> (ca. 2420 nt)</p> <p>Initiale Denaturierung 95 °C, 2 Min.</p> <p>gefolgt von 35 Zyklen:</p> <p>94 °C, 35 Sek. [Denaturierung]</p> <p>66 °C, 45 Sek. [Annealing]</p> <p>72 °C, 3 Min. [Elongation]</p> <p>Ende Zyklen</p> <p>finale Elongation bei 72 °C, 5 Min.</p> <p>und Abkühlung auf 8 °C</p>	<p><b><u>Bach1</u></b> (ca. 1150 nt)</p> <p>Initiale Denaturierung 95 °C, 2 Min.</p> <p>gefolgt von 35 Zyklen:</p> <p>94 °C, 20 Sek. [Denaturierung]</p> <p>60 °C, 30 Sek. [Annealing]</p> <p>72 °C, 1,3 Min. [Elongation]</p> <p>Ende Zyklen</p> <p>finale Elongation bei 72 °C, 5 Min.</p> <p>und Abkühlung auf 8 °C</p>
---	--

#### 2.4.2.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Das Trennen (Aufreinigung) der PCR-Produkte von Primern, dNTPs, Polymerase und Salzen erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) über Anionenaustauscher-Säulen (Spin-Columns) in einer Mikrozentrifuge nach folgendem Protokoll:

- 1) Auf das PCR-Produkt werden 5 Volumen Puffer PB gegeben (250 µl bei 50 µl PCR-Produkt). Enthält der Puffer PB einen PH-Indikator ist darauf zu achten, dass die Färbung des Produktes gelb ist. Nimmt das Produkt eine orange oder violette Färbung an, werden 10 µl 3M NaAc zugegeben.
- 2) Spin-Column in ein 2 ml Collecting-Tube stecken und die zuvor gemischte Probe in das Spin-Column pipettieren. Anschließend für 30-60 Sek. bei 17900 x g (13000 rpm) zentrifugieren.
- 3) Durchlauf verwerfen und Spin-Column in dasselbe Tube zurückstecken.
- 4) In einem Waschschrift werden 750 µl Puffer PE in das Spin-Column gegeben und für 30-60 Sek. bei 17900 x g (13000 rpm) zentrifugiert.
- 5) Durchlauf verwerfen und Spin-Column in dasselbe Tube zurückstecken.
- 6) Nun wird die Membran des Spin-Columns in einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 1 Min. abgetrocknet.
- 7) Für die Eluierung der DNA wird das Spin-Columnn in ein autoklaviertes 1,5 ml Tube gesteckt und 50 µl Elutionspuffer EB (oder H<sub>2</sub>O) in die Mitte der Membran gegeben und 1 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Das Eluat mit der gereinigten DNA wird dann bis zum Ansetzen der Cycle-Sequencing-Reaktion bei 8 °C aufbewahrt.

#### 2.4.3 DNA-Sequenzierung

Die Nukleotidsequenz des Amplikons wurde über die Didesoxy-DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) bestimmt. Mit der enzymatischen Methode wird doppelsträngige DNA (Amplikon) linear amplifiziert. Der Reaktionsansatz enthält neben dH<sub>2</sub>O, Polymerase, Template, einem Primer, dNTPs, auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs. Ausgehend von einem durch den Primer definierten Anfangspunkt beginnt die Synthese der komplementären DNA. In dem stochastischen Prozess entscheidet der Zufall, ob ein komplementäres dNTP oder ddNTP in die Oligonukleotidkette eingebaut wird. Nach dem Einbau eines ddNTPs kommt die Synthese jedoch zum Erliegen (Kettenabbruch), weil in 3' Position der Ribose keine OH-Gruppe mehr zur Kettenverlängerung zur Verfügung steht. Dadurch entsteht eine Population von unterschiedlich großen Oligonukleotiden, die alle mit einem ddNTP enden und so jede Position der Template wiedergeben. In einem automatisierten Verfahren werden die Fragmente über Gelelektrophorese in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Jedes der vier ddNTPs ist spezifisch markiert und kann so von einem Fotodetektor identifiziert werden. Die Fragmente wandern der Größe nach mit

unterschiedlicher Geschwindigkeit durch eine Kapillare. Somit werden die Art der Base und ihre Position von dem Fotodetektor erfasst und in einem Elektropherogramm abgebildet.

#### 2.4.3.1 Cycle-Sequencing (Sanger Reaktion)

Für die Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Reaktion wurde der (DTCS) Quick-Start-Kit von Beckman Coulter verwendet.

Der Reaktionsansatz wurde unter der Sterilbank in 0,2 ml Tubes angesetzt. Zwei unterschiedliche Volumina und Zusammensetzungen wurden verwendet.

Der 10 µl Standard-Reaktionsansatz enthielt 1-3 µl aufgereinigte Template, 2 µl Primer (1,6 pmol), 3 µl DTCS Quick-Start-Master-Mix (Polymerase, dNTPs, ddNTPs) und 2-4 µl dH<sub>2</sub>O. Ein zweiter 16 µl Reaktionsansatz speziell zum Sequenzieren von Homopolymeren enthielt 1 µl aufgereinigte Template, 2 µl Primer (1,6 pmol), 3 µl DTCS Quick Start Master Mix (Polymerase, dNTPs, ddNTPs), 2 µl MgCl<sub>2</sub> und 8 µl Betain.

Die Amplifikation erfolgte in einem vollautomatischen Thermocycler in einem zwei- oder dreistufigen zyklischen Temperaturverlauf (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Temperaturverläufe der Cycle-Sequencing-Reaktion.

Programm 1 30 Zyklen [Denaturierung] 96 °C, 20 Sek. [Annealing und Elongation] 60 °C, 4 Min. Ende Zyklen und Abkühlung auf 8 °C	Programm 2 30 Zyklen [Denaturierung] 96 °C, 20 Sek. [Annealing] 50 °C, 20 Sek. [Elongation] 60°C 4 Min. Ende Zyklen und Abkühlung auf 8 °C
---	---

#### 2.4.3.2 Aufreinigung der Cycle-Sequencing-Produkte

Die Trennung der Cycle-Sequencing-Produkte von Enzymen, dNTPs, ddNTPs, Primern und Salzen erfolgte über Ethanolfällung oder Magnetic Beads nach folgenden Protokollen:

##### Ethanolfällung

- 1) Master Mix ansetzen und vortexen (je Probe: 10 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl NaAc, 2 µl EDTA, 1 µl Glycogen).
- 2) Cycle-Sequencing-Produkte kurz anzentrifugieren.
- 3) 15 µl Master Mix in 0,5 ml Tube vorlegen und Template dazugeben.
- 4) Zugabe von 60 µl eisgekühltem EtOH (95%; -20 °C), gut vortexen.
- 5) 10 Min. bei 13.200 rpm (full speed) zentrifugieren. Flüssigkeit mit Pipette abziehen und verwerfen.
- 6) Zugabe von 200 µl eisgekühltem EtOH (70%; -20 °C), nicht vortexen.
- 7) 5 Min. bei 13.200 rpm (full speed) zentrifugieren. Flüssigkeit mit Pipette abziehen und verwerfen.



- 8) Zugabe von 200 µl eisgekühltem EtOH (70%; -20 °C), nicht vortexen.
- 9) 5 Min. bei 13.200 rpm (full speed) zentrifugieren. Flüssigkeit mit Pipette abziehen und verwerfen.
- 10) 4 Min. in Trockenzentrifuge (Speed Vac) trocknen (low).
- 11) Nach dem Trocknen Probe in 30 µl SLS lösen, kurz vortexen und 1 Min. stehen lassen, wieder vortexen und kurz anzentrifugieren. Proben mit Öl überschichten und sequenzieren.

#### Aufreinigung mit Agencourt CleanSEQ Magnetic Beads

- 1) 10 µl CleanSeq auf 10µl Cycle-Sequencing Produkt geben (vor Gebrauch Beads schütteln).
- 2) 42 µl 85% EtOH auf Probe geben, gut resuspendieren und auf Mikrotiterplatte überführen. Schritte 3-4 sind auf Magnetplatte durchzuführen.
- 3) Anschließend für 3 Min. Mikrotiterplatte in Magnetplatte stellen bis ein brauner Beadrand sichtbar wird, Flüssigkeit abziehen und verwerfen.
- 4) 100 µl 85% EtOH dazu geben, 30 Sek. warten, Flüssigkeit abziehen und verwerfen.
- 5) Mikrotiterplatte von Magnetplatte nehmen, Probe in 40 µl SLS lösen (Beads nicht trocken werden lassen) und gut resuspendieren.
- 6) Beads pelletieren: dazu Mikrotiterplatte auf Magnetplatte stellen (nicht in die Aussparungen der Magnetplatte einsetzen) und 3-5 Min. warten, bis Flüssigkeit klar ist und Beads am Boden pelletiert sind. Proben mit Öl überschichten und sequenzieren.

### 2.4.3.3 Sequenzierung und Assembling

Die Proben wurden auf einem automatischen Kapillarsequenzierer von Beckman Coulter (CEQ™ 8000) analysiert. Weil die amplifizierten Gene größer waren als die Sequenzieretechnologie von Beckman Coulter in einem Lauf zu lesen vermag (read-length ca. 500-600 bp), mussten die Fragmente in mehreren Läufen mit zusätzlichen internen Primern sequenziert werden. Die sich überlappenden Fragmente wurden anschließend mit der DNA-Sequenz-Software Sequencher® kontrolliert und zusammengesetzt (Assembling).

## 2.5 Analytische Methoden

### 2.5.1 Alignments

Alignments homologer Sequenzen wurden mit dem Clustal-Algorithmus (Thompson et al. 1994), integriert in das Programmpaket BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999), automatisch erstellt und bei Bedarf manuell editiert. Probleme bei der Konstruktion des Alignments durch Verlust (Deletion) oder Einführung (Insertion) von Nukleotiden, den sogenannten Lücken (gaps), traten in den proteincodierenden mt-Genen (Cytb, COI, ND5) erwartungsgemäß nicht auf. Längenpolymorphismen wurden nur im Alignment des proteincodierenden Kerngenes *Bach1* gefunden. Die Nukleotidsequenzen der "Großvipern" (*Bitis*, *Daboia*, *Montivipera*, *Macrovipera*, *Pseudocerastes*, *Sistrurus*) sind gegenüber denen der Gattung *Vipera* durch eine Leucin und Tryptophan codierende Insertion um sechs Basen verlängert.

Die Elektropherogramme der Kerngene Rag1 und Bach1 liegen teilweise als Allelvarianten vor (Abbildung 3). Ihr Anteil ist in beiden Genen ungleich. Die Sequenzen des Locus Rag1 waren zu 37,8% heterozygot ( $n=74$ ), die des Gens Bach1 hingegen nur zu einem Anteil von 26% ( $n=77$ ).

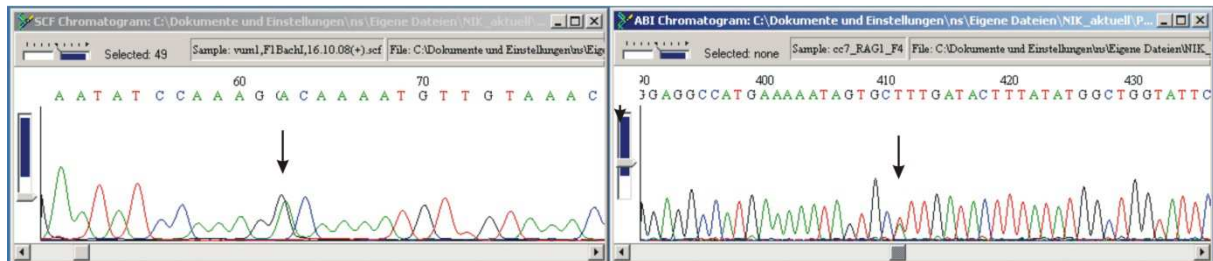


Abbildung 3: Elektropherogramme heterozygoter Sequenzen der Kerngene Bach1 (links) und Rag1 (rechts). Die Sequenzen zeigen Allelvarianten eines Genabschnittes. In der linken Abbildung unterscheiden sich die Allele in Position 62 durch die Basen Guanin und Adenin. Der Doppelpeak in der rechten Sequenz zeigt die Allelvarianten in Position 411 mit Thymin und Adenin.

Die Allelvarianten unterscheiden sich durch Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs), die ungleichmäßig häufig auftreten. Ihr Anteil liegt in beiden Loci (Rag1, Bach1) deutlich unter 1% und kann zwischen den Proben der gleichen Art stark verschieden sein. Die höchste Anzahl heterozygoter Sequenzpositionen wurden bei *Vipera aspis francisciredi* (Vaf3) im Gen Bach1 mit sieben SNPs auf 1096 bp festgestellt (= 0,64%).

Heterozygote Sequenzpositionen sind ambiguo, da sie Informationen zweier Allele tragen. Unspezifische Basen werden nach der IUPAC-Nomenklatur mit Symbolen synonymisiert (Cornish-Bowden 1985), die nicht von allen Programmen zur Rekonstruktion der Phylogenie erkannt werden. Unspezifische Positionen wurden daher von den Analysen ausgeschlossen und im Alignment durch Fragezeichen (?) ersetzt.

In einigen Fällen mussten die Loci mit internen taxonspezifischen Primern sequenziert werden. Die fehlenden Nukleotidpositionen dieser Sequenzen wurden im Alignment ebenfalls durch Fragezeichen ersetzt. Fragezeichen werden von den meisten Programmen als fehlende Sequenzinformation erkannt.

Zusammengesetzte Alignments aus Sequenzen mehrerer Gene wurden mit dem Programm Phyutility (Smith & Dunn 2008) konkateniert.

Bei der Übersetzung von DNA-Sequenzen in die korrespondierende Aminosäuresequenz ist es essentiell, dass alle Sequenzen im gleichen Leseraster sind und nur homologe Aminosäuren verglichen werden. Ist das Start- und Stoppcodon des Leserahmens nicht bekannt, kann eine DNA-Sequenz in drei verschiedene Aminosäuresequenzen übersetzt

werden. Um zu gewährleisten, dass die übersetzten Aminosäuresequenzen biologisch existierenden Proteinen entsprechen, wurden die Sequenzen dem Leserahmen annotierter Proteine aus der Proteindatenbank UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch/sprot/>) angepasst und verglichen (vergl. z.B. Opperdoes 2009).

Für die Erstellung von multiplen Sequenzalignments ist eine Fülle von Programmen verfügbar (Notredamme 2007), die mit unterschiedlichen Algorithmen versuchen, ideale Lösungen für multiple Sequenzalignments zu finden. Doch selbst die besten Programme mit einer Genauigkeit von 80-90% sind in bestimmten Sequenzregionen nicht fehlerfrei. Es wird daher angenommen, dass der Ausschluss ungenau alignierter Sequenzpositionen die Akkuratheit nachfolgender Berechnungen erhöht (Talavera & Castresana 2007).

Zur Verbesserung des „Signal-to-noise“-Verhältnisses wurde das multiple Aminosäuresequenzalignment mit dem Programm trimAl (Capella-Gutiérrez et al. 2009) optimiert und von 3541 auf 3455 Aminosäuren reduziert.

### 2.5.2 Annotation der Mitogenome

Protein- und rRNA-codierende Gene wurden über den Abgleich homologer Sequenzen mit Hilfe des BLAST-Programms in NCBI oder über das Genom-Annotationsprogramm DOGMA (<http://dogma.ccbb.utexas.edu/>) identifiziert. Als Sequenzvorlage diente insbesondere das Mitogenom von *Agkistrodon piscivorus* (gi 156878356).

Der genetische Code der Mitochondrien weicht vom „universellen“ Code ab (Boore et al. 2005). So gibt es zu dem „universellen“ Start-Codon für Methionin (ATG) im Mitogenom die Alternativen ATN oder NTG. Abweichende Stopp-Codons können an der ersten Codonposition ein T oder ein TA an der ersten und zweiten Position aufweisen. Die Festlegung der Start- und Stop-Codons protein-codierender Gene kann daher zweideutig sein.

Das Ende der rRNA-Gene ist ohne Information ihrer Transkripte häufig nicht präzise bestimmbar. Ihre Enden wurden über Sequenzähnlichkeiten zu annotierten mt-Genomen festgelegt.

Die Identifizierung der t-RNAs stellt die größte Herausforderung bei der Annotation der Mitogenome, weil nur sehr geringe Sequenzähnlichkeiten zwischen verschiedenen Tiergruppen und damit wenig Möglichkeiten zum Sequenzabgleich bestehen (Boore et al. 2005). Zum Auffinden der tRNAs wurde das Programm tRNAscan (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) verwendet.

### 2.5.3 Stammbaumrekonstruktion und -validierung

#### 2.5.3.1 Sättigungsanalysen

DNA verändert sich in der evolutionären Zeitachse durch Ansammlung von Mutationen (siehe Reviews bei Page & Holmes 2001, Lemey et al. 2009). Basen können ausgetauscht (Substitution), neu eingefügt (Insertion) oder ausgeschnitten (Deletionen) werden. Der genetische Code ist in proteincodierenden Genen in einem Tripletcode verschlüsselt, bei dem jeweils drei Basenpaare (= ein Codon) eine Aminosäure festlegen. Die aufeinander folgenden Codons sind ohne Unterbrechungen und Überlappungen kontinuierlich angeordnet – sie folgen einem Leseraster (ORFs). Der genetische Code ist degeneriert (redundant), weil 20 Aminosäuren durch 61 Codons festgelegt werden. Eine Punktmutation an der dritten Codonposition resultiert nur zu 30% in einer Änderung der Aminosäure. Eine Mutation an der ersten Position führt hingegen zu 96% und eine Mutation an der zweiten Position immer zu einer Änderung der Aminosäure (Xia et al. 1996). Mutationen, die keinen Wechsel der Aminosäure zur Folge haben, werden synonyme Mutationen genannt. Das Gegenteil ist bei nicht synonymen Mutationen der Fall. Nicht synonyme Mutationen können im Gegensatz zu synonymen Mutationen auch die Struktur und Funktion von Proteinen beeinflussen. Wirkt sich eine Mutation nachteilig auf die Fitness eines Organismus aus, wird die entsprechende Genvariante durch "Purifying-selection" aus dem Genpool entfernt. Neutrale oder sogenannte "Silent-mutations", die keinen Effekt auf die Funktion von Proteinen haben, werden durch natürliche Selektion nicht benachteiligt und bleiben durch genetische Drift als Polymorphismen erhalten. Vorteilhafte Mutationen hingegen werden durch positive Selektion im Genpool besonders schnell fixiert. Zwei orthologe Gene, die sich unabhängig voneinander entwickeln, verändern sich im Laufe der Evolution durch Mutation. Das Maß ihrer Divergenz ist die genetische Distanz und die Grundlage für die Berechnung von Genealogien.

Aus sterischen und chemischen Gründen finden Substitutionen am leichtesten innerhalb der gleichen Nukleotidklassen statt, also von Purin zur Purinbase und von Pyrimidin zur Pyrimidinbase (z.B. Xia et al. 2003). Die resultierenden Mutationen bezeichnet man als Transitionen. Bei Transversionen hingegen mutieren die Basen zwischen den Nukleotidklassen von Purin zu Pyrimidin und vice versa. Rein stochastisch müssten Transversionen doppelt so wahrscheinlich sein wie Transitionen, denn vier möglichen Transitionen ( $A \leftrightarrow G$ ,  $C \leftrightarrow T$ ) stehen acht mögliche Transversionen ( $A \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow T$ ,  $G \leftrightarrow C$ ,  $G \leftrightarrow T$ ) gegenüber. Tatsächlich sind jedoch Transitionen im genetischen Code wahrscheinlicher als Transversionen (z.B. Xia et al. 2003). In schnell evolvierenden Genen kann genetische Drift dazu führen, dass genetische Sequenzähnlichkeit mit fortschreitender Zeit ausradiert wird,

selbst wenn ihre Genprodukte eine identische Funktion haben. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine zweite Mutation oder eine Rückmutation die erste Mutation verschleiert, steigt mit der Gesamtzahl an Mutationen und mit der verstrichenen Zeit an. Besonders deutlich wird dieser Effekt auf der dritten Codonposition. Das führt zur Unterschätzung von genetischen Distanzen zwischen zwei orthologen Sequenzen. In proteincodierenden Genen sind die ersten beiden Positionen weniger anfällig gegenüber Substitutionen, weil die Veränderung eine Änderung der Aminosäure und des dazugehörigen Proteins nach sich zieht. Nicht so die dritte Codonposition, die sogenannte "Wobble"-Position, die häufig mehrfach substituiert wird, ohne die korrespondierende Aminosäure zu ändern (z.B. Xia et al. 2003). Infolgedessen bildet die beobachtete unkorrigierte genetische Distanz (p-Distanz) zwischen zwei Protein- oder Nukleotidsequenzen nicht die tatsächliche evolutionäre Distanz ab. Mit Hilfe von Substitutionsmodellen gelingt es, diesen Fehler einzuschätzen und in den Analysen zu berücksichtigen (z.B. Posada 2009).

Mutationsraten sind jedoch zwischen Genen unterschiedlich. "House-keeping-genes", die in der Zelle Träger von lebenswichtigen Funktionen sind, evolvieren besonders langsam, sie sind prädestiniert für Großgruppen-Phylogenien (z.B. Opperdoes 2009).

Bei der Rekonstruktion phylogenetischer Stammbäume für Großgruppen-Phylogenien ist es üblich, die dritte Codonposition von proteincodierenden Genen von den Analysen auszuschließen (z.B. Opperdoes 2009). Für lange Sequenzen bietet es sich jedoch an, den offenen Leserahmen in die korrespondierende Proteinsequenz zu übersetzen, denn phylogenetische Information wird schneller in der DNA-Sequenz ausgelöscht als in den dazugehörigen Aminosäuren. Die Übersetzung von DNA in Aminosäuresequenzen reduziert störende Signale zu Gunsten phylogenetisch verwertbarer Information (z.B. Opperdoes 2009). Im Fall von nahe verwandten Organismen, bei denen keine Sättigung durch mehrfache Substitutionen eingetreten ist, sollte die direkte Nukleotidsequenz verwendet werden.

Sättigungsanalysen wurden getrennt für die verschiedenen Datensätze und Gene mit dem Programm DAMBE (Xia & Xie 2001) durchgeführt. Für die Sättigungsanalyse alignierter Sequenzen wurden graphische und statistische Methoden genutzt.

Transitionen sind nach empirischen Untersuchungen häufiger als Transversionen (Salemi 2009). Mit zunehmender genetischer Distanz sollten beide linear ansteigen, wobei Transitionen in der Überzahl sind. Je älter die Organismengruppen sind, desto divergenter sind die Sequenzen. Mit zunehmender genetischer Distanz steigt die Zahl der Transversionen gegenüber den Transitionen, bis die Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen gänzlich von der Nukleotidfrequenz abhängt und keine phyletischen Beziehungen mehr

wiederspiegelt (z.B. Xia et al. 2003). Um das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen zu untersuchen und den Überschneidungspunkt sichtbar zu machen, wurden Transitionen und Transversionen gegen die korrigierte genetische Distanz aufgetragen. Darüber hinaus wurde der Information Entropy-based Index of Substitution Saturation nach Xia et al. (2003) in DAMBE durchgeführt.

### 2.5.3.2 Berechnung des Evolutionsmodells

Alle Versuche, die phylogenetischen Beziehungen rezenter Organismen zu rekonstruieren, setzen Annahmen voraus, die als mathematische Modelle formuliert werden. Mit Hilfe der Modelle versucht man, die evolutionären Muster alignierter Nukleotide oder Aminosäuren zu erklären und den evolutionären Wechsel homologer Alignmentpositionen entlang der Zeitachse abzuschätzen. Reviews über formale Modelle (Swofford et al. 1996, Whelan & Goldman 2001) und Modellauswahl (Posada & Buckley 2004, Sullivan & Joyce 2005) vermitteln einen kompakten Überblick.

Das korrekte Modellieren der Substitutionsparameter erhöht die Wahrscheinlichkeit, den besten phylogenetischen Baum zu finden. Das zeigen Untersuchungen an simulierten (Gaut & Lewis 1995) und echten (Sullivan & Swofford 1997) Sequenzdaten. Diese Erkenntnisse haben zur Entwicklung noch realistischerer Modelle zur Sequenzevolution beigetragen, die ungleiche Basenfrequenzen (Felsenstein 1981), Ratenheterogenität (Yang 1994) oder Codonpositions-Partitionierung (Shapiro et al. 2006) berücksichtigen.

Allerdings liefert das beste Modell nicht notwendigerweise auch den akkuratesten Baum (Buckley et al. 2001, Buckley 2002, Buckley & Cunningham 2002). Dafür verantwortlich ist ein Trade-off zwischen „Bias“ und „Variance“ (Burnham & Anderson. 2003). Mit steigender Komplexität der Modellparameter wird der Datensatz präziser modelliert – der „Bias“ wird reduziert. Je komplexer das Modell jedoch ist, desto mehr Parameter müssen berechnet werden – es steigt die „Variance“. Das wiederum reduziert die Genauigkeit der Berechnungen.

In beiden Fällen führen zu parameterreiche als auch unzulänglich angepasste Modelle zu topologischen Fehlern und falscher Berechnung der Zweiglängen (Kelchner & Thomas 2006). Ein Modell muss daher gut, aber nicht exakt sein.

Diverse Computerprogramme und Onlineportale helfen bei der Wahl des richtigen Substitutionsmodells. Das am weitesten verbreitete Programm ist Modeltest, das auf die Arbeit von Posada & Crandall (1998) zurück geht. Die geeigneten Substitutionsmodelle für die Datensätze 2566 und 5434 wurden mit dem Programm MrModeltest 2.2 (<http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>) berechnet. MrModeltest ist eine modifizierte Version von Modeltest 3.6 und ist speziell für die Anwendung von MrBayes

entwickelt worden. Unter 24 Kandidatenmodellen wählt das Programm nach dem hierarchischen Likelihood-ratio-test (hLRT) und dem Akaike-information-criterion (AIC) das geeignetste aus.

Modelle zur Evolution von Aminosäuresequenzen basieren, anders als Nukleotidmodelle, auf empirischen Matrizes. Für den Aminosäuredatensatz 3542 wurde das CAT-Modell verwendet, das robust gegen „Long-branch-attraction“ ist und sich für hoch gesättigte Sequenzen eignet (Lartillot et al. 2007).

### 2.5.3.3 Wahl der Außengruppen

Die meisten Methoden zur Baumrekonstruktion produzieren ungewurzelte Topologien, die erst im Nachhinein mit einer Außengruppe gewurzelt werden. Die Außengruppe dient dazu, die Innengruppe eines Baumes zu bewurzeln und dem gesamten Baum damit eine Leserichtung zu geben. Als Außengruppe eignen sich Taxa, die eindeutig entfernter mit allen Taxa der Innengruppe verwandt sind als alle Taxa der Innengruppe untereinander. Alternativ kann die Wurzel auch mit Genduplikationen bestimmt werden.

Die Phylogenien der altweltlichen Viperinae wurden mit Repräsentanten der Crotalinae gewurzelt. Das Schwesterverhältnis zwischen Viperinae und Crotalinae ist morphologisch und molekulargenetisch (z.B. Wüster et al. 2008) hinreichend gut bewiesen. Phylogramme zu dem Datensatz 2566 wurden mit den Außengruppentaxa *Agkistrodon piscivorus*, *Ovophis okinavensis* (Crotalinae) gewurzelt, die der korrespondierenden Datensätze 1920 und 3514 mit *Sistrurus miliarius barbouri* (Crotalinae).

Für den Datensatz 3542 wurde *Xenopus laevis* als basaler Vertreter ursprünglicher Tetrapoden gewählt und basal zu den Sauropsida positioniert.

### 2.5.3.4 Evaluation von Stammbäumen („Branch-support“)

Keine phylogenetische Baumrekonstruktionsmethode garantiert, den optimalen Baum zu finden (Review z.B. bei Lemey et al. 2009). Ein einzelner Baum hat keine Aussagekraft über die Zuverlässigkeit der Zweige. Nur in Verbindung mit statistischen Verfahren kann die Topologie eines Baumes evaluiert werden. Die populärsten Verfahren zur statistischen Absicherung von Knoten sind der Bootstrap und Jackknife. Beim Bootstrap-Verfahren werden neue Zufallsdatensätze (Replicates) durch Ziehen mit Zurücklegen aus dem Originaldatensatz konstruiert. Die zufällig erstellte Merkmalsmatrix hat den gleichen Umfang wie die Originalmatrix. Für jede der neuen Matrizes wird ein neuer Baum berechnet. Aus der Summe der einzelnen „Replicate-Bäume“ wird zum Ende ein Bootstrap-Baum erstellt, der die Häufigkeit der gefundenen Knoten angibt.

Eine Alternative ist das Jackknife-Verfahren, das ähnlich dem Bootstrapping, für jedes „Replicate“ eine Zufallsmatrix erstellt, für die dann ein optimaler Baum gefunden wird. Im Unterschied zum Bootstrapping wird aus der Matrix ein definierter Anteil zufällig ausgewählter Merkmale gelöscht.

Bootstrap und Jackknife sind unabhängig von der Baumrekonstruktionsmethode anwendbar. Ist die Stichprobe und die Anzahl der „Replicates“ hoch genug, wird die Variabilität des phylogenetischen Signals akkurat abgebildet.

In der bayesianischen Statistik generiert ein MCMC-Sampler einen Pool von Bäumen, die zur Berechnung der Posterior-Probabilities genutzt werden (siehe Kapitel bayesianische Inferenz).

### **2.5.3.5 Rekombinationsanalyse**

Der Austausch von Allelen zwischen homologen Chromosomen (Rekombination) ist ein biologischer Mechanismus, der nicht nur evolutionär sondern auch entwicklungsphysiologisch von grundlegender Bedeutung ist. Neben der Mutation als wichtigstem Faktor der genetischen Variabilität, erzeugt auch die Rekombination neue genetische Kombinationen. Der Austausch von genetischem Material zwischen Organismen erhöht nicht nur die Allelvariabilität, sondern führt auch zum Austausch ihrer evolutionären Geschichte. Rekombination verändert das evolutionäre Signal und kann bei Missachtung phylogenetische Analysen fehlleiten. Wegen der fundamentalen Bedeutung, die der Rekombination bei der genomischen Evolution beigemessen wird, sind eine Reihe neuer Testverfahren entwickelt worden, die genetische Chimären aufspüren können (siehe Reviews bei Lemey & Posada 2009 und Salminen & Martin 2009).

Ersetzt die Donorsequenz eine homologe Region des Akzeptormoleküls, spricht man von homologer Rekombination. Wird ein Allel durch „Crossover“ mit einer nicht homologen Sequenz ausgetauscht, bezeichnet man den Vorgang als nicht homologe Rekombination. Rekombination ist jedoch nur erkennbar, wenn die beteiligten Genome genetisch verschieden waren. Genome, die durch Rekombination durchmischt wurden, bestehen aus einem Mosaik von Genen unterschiedlicher evolutionärer Geschichte. Ein sich bifurkat verzweigender Baum kann derart komplexe Ereignisse auf innerartlichem Niveau nicht korrekt abbilden (Posada & Crandall 2001, vergl. auch Avise 2007).

Unterschiedliche bioinformatische Strategien sind entwickelt worden, um rekombinante Gensequenzen aufzuspüren (Posada et al. 2002), Bruchstellen aufzuzeigen und Parentalsequenzen zu benennen. Für klonal vererbte Mitochondriengene hat die Rekombination keine Bedeutung. Daher wurden nur die Kerngensequenzen Rag1 und



Bach1 mit dem Programm RDP3 (<http://darwin.uvigo.es/rdp/rdp.html>) auf das Vorhandensein von Rekombination getestet.

#### 2.5.3.6 Kongruenz-Test verschiedener Topologien

Phylogenetische Bäume orthologer Gene können trotz hoher statistischer Unterstützung inkompatible Topologien aufweisen (Beiko & Hamilton 2006). Der Grund für die Inkongruenz kann durch horizontalen Gentransfer (Creevey et al. 2004, Garcia-Vallve et al. 2003), versteckte Paraloge (Creevey et al. 2004) und falsche Modellspezifikation (Rokas et al. 2003) bedingt sein. Zudem können die Rekonstruktionsmethoden (Distanz, Likelihood, Parsimonie oder Bayes) zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Mit Hilfe topologischer Tests können alternative Bäume verglichen und auf Signifikanz getestet werden.

Die Unterschiede zwischen den MP-, BI- und ML-Bäumen des Datensatzes 5434 wurden mit Likelihood basierten Testverfahren auf signifikante Unterschiede geprüft. Verwendet wurden der Kishino-Hasegawa-Test (KH-Test, Kishino & Hasegawa 1989), der Shimodaira-Hasegawa-Test (SH-Test, Shimodaira & Hasegawa 2001) und der Approximately Unbiased Test (AU-Test, Shimodaira 2002). Dazu wurden zunächst mit TREE-PUZZLE (Schmidt et al. 2002) die „Site-likelihoods“ der Bäume berechnet und anschließend mit CONSEL ([www.is.titech.ac.jp/~shimo/prog\(consel/\)](http://www.is.titech.ac.jp/~shimo/prog(consel/))) die „Multiscaled-bootstrap-samples“ generiert.

#### 2.5.3.7 Maximum Parsimonie (MP)

Maximum Parsimonie (MP) zeichnet sich durch seine gedankliche Schlichtheit aus. Das minimalistische Prinzip bevorzugt die sparsamste (most parsimonious) Erklärung. Eine Übersicht zur Methode geben Swofford & Sullivan (2009). Für die Parsimonie-Analyse wird jede Position im Alignment (Matrix) als eigenes Merkmal mit unterschiedlichen Merkmalszuständen betrachtet. Das Ziel der Parsimonie-Analyse ist es, den Baum zu finden, der in der Summe über alle Alignmentpositionen die geringste Anzahl Zustandsänderungen (Schritte) aufweist. Positionen im Alignment, die keine phylogenetische Information aufweisen, werden als invariable Positionen bezeichnet. Variable Positionen können Parsimonie-informativ oder -uninformativ sein. Autapomorphien einzelner Taxa sind Parsimonie-uninformativ, weil mindestens zwei Merkmalszustände vorkommen müssen, die bei mindestens zwei Taxa vertreten sind.

Im Unterschied zu Bayesian Inference, Maximum Likelihood und Neighbour Joining nimmt das Parsimonie-Prinzip für sich in Anspruch, frei von formalen Modellen zu sein. Der Verzicht auf die Distanzkorrektur macht die Methode anfällig für „Long-branch attraction“.

Maximum Parsimonie-Analysen wurden mit dem Programm PAUP\*4.0b10 (Swofford 2001) unter heuristischen Baumsuchverfahren (TBR tree bisection-reconnection) mit 100 random-additions durchgeführt. Auf der Suche nach dem besten Baum, teilt das Verfahren einen internen Zweig in zwei Teilbäume. Danach werden die Zweige wieder über neue interne Knoten verknüpft und nach 100 Rearrangements die Topologie mit dem besten Score bevorzugt (siehe Knoop & Müller 2009). Merkmalszustände wurden empirisch mit einem 2:1 Transversion-Transition-Verhältnis gewichtet, wonach Transitionen wahrscheinlicher werden, weil die Kosten einer Transversion doppelt so hoch sind wie die einer Transition. Um die Verlässlichkeit der Knoten einzuschätzen, wurden 1000 Bootstrap-Wiederholungen mit je 10 „Random-taxon-additions“ pro Replikation durchgeführt.

#### **2.5.3.8 Maximum Likelihood (ML)**

Maximum Likelihood (ML) ist ein parametrisches Schätzverfahren, das versucht, phylogenetische Hypothesen über ihre Wahrscheinlichkeit zu bewerten (siehe Review bei Schmidt & von Haeseler 2009). Unter Annahme eines Evolutionsmodells und bestimmten Hypothesen zur Baumstruktur ist es möglich, die Wahrscheinlichkeit zu berechnen, unter der die Daten (Sequenzen) am plausibelsten sind (Felsenstein 1981). Die Likelihood-Funktion ist die Wahrscheinlichkeit der Daten (Sequenzen) unter einer gegebenen Hypothese. Voraussetzung dafür ist, dass das Evolutionsmodell der zu schätzenden Variablen (Alignmentpositionen, Stichprobe, Verzweigungsmuster, Astlängen) bekannt ist. Auf der Grundlage eines vorgegebenen Stammbaumes wird für jede Position des Alignments die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass der gegebene Stammbaum die beobachteten Daten unter dem angenommenen Evolutionsmodell hervorgebracht hat. Das Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten aller Alignment-Positionen ist die Gesamtwahrscheinlichkeit des Datensatzes. Für keine der Methoden mit einem Optimalitätskriterium (MP, ML, Distanz Methoden) existiert ein Algorithmus, der den optimalen Baum findet. Eine erschöpfende Suche nach dem besten Stammbaum ist unter ML so ungeheuer rechen- und zeitintensiv, dass man auf heuristische Suchmethoden („Stepwise-addition“, „Star-decomposition“, „Branch-swapping“) ausweichen muss.

In Bezug auf die Geschwindigkeit sind eine Reihe neuer ML-Algorithmen PAUP deutlich überlegen. Besonders hervorzuheben sind PHYML (Guindon & Gascuel 2003), RAxML (Stamatakis 2006) sowie die Programme Metapiga (Lemmon & Milinkovitch 2002) und GARLI (Zwickl 2006), die evolutionäre Algorithmen verwenden.

Die ML-Analysen wurden mit dem Programm PHYML durchgeführt.

### 2.5.3.9 Bayesianische Inferenz (BI)

Bayesianische Statistik ist in der Phylogenetik erst mit dem Programm MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003) populär geworden und stellt mittlerweile die am häufigsten verwendete Methode zur Phylogenie-Rekonstruktion dar. Eine theoretische Übersicht zur Methode findet sich bei Ronquist et al. (2009). Wie Maximum Parsimonie und Maximum Likelihood ist Bayesian Inference eine charakterbasierte Methode.

Bayesianische Inferenz bewertet Bäume nach ihrer „Posterior“-Wahrscheinlichkeit unter gegebenem Modell, den „Priors“ und dem Alignment. Anders als ML sucht BI nicht nach einem einzigen optimalen Baum, sondern berechnet alle Bäume der Posterior-Verteilung. Allerdings ist das analytische Berechnen der „Posterior-probabilities“ so zeitaufwendig, dass zufällige Stichproben aus der Wahrscheinlichkeitsverteilung simuliert werden müssen. Dazu nutzt man den Markov-Chain-Monte-Carlo-Sampler (MCMC). Der Algorithmus wählt zufällig aus der Posterior-Verteilung einen Baum mit bestimmter Topologie, Zweiglängen und Substitutionsparametern als Ausgangszustand einer Kette aus. Die Topologie wird nun zusammen mit den anderen Parametern zufällig verändert und eine neue Baumgeneration vorgeschlagen. Erfüllt der Quotient der „Posterior-probabilities“ beider Bäume bestimmte Bedingungen, wird der neue Baum akzeptiert. Ist der neue Baum unter gegebenem Modell und Datensatz wahrscheinlicher als der bestehende, wird er akzeptiert und wird als neue Baumgeneration Teil der wachsenden Kette. Der Prozess setzt sich fort, bis eine definierte Anzahl an Generationen erreicht ist. Mit steigender Anzahl Generationen erreicht die Kette eine stabile Phase, in der die Likelihoods um einen bestimmten Wert pendeln. Alle Bäume, die ab diesem Zeitpunkt gespeichert werden, repräsentieren die Stichprobe aus der Posterior-Verteilung.

Wenn die Stichprobe aus der stationären Phase groß genug ist, kann der Prozentsatz, mit dem eine bestimmte Klade bei den Bäumen auftritt, als Wahrscheinlichkeit (Posterior-probability) interpretiert werden, dass die gefundene Topologie richtig ist.

MrBayes nutzt einen Spezialfall von MCMC, den Metropolis-coupled-Markov-Chain-Monte-Carlo-Algorithmus (MC<sup>3</sup>). Der Algorithmus soll die Ketten davor bewahren, in lokalen Optima stecken zu bleiben. Dazu laufen vier voneinander unabhängige Ketten mit unterschiedlichem Startbaum nebeneinander. Drei der Ketten haben durch erhöhte Temperaturen nivellierte „Posterior-probability“-Oberflächen, damit ihre Ketten schneller zwischen Peaks wechseln können. Sie ermöglichen der vierten, sogenannten kalten Kette, die eigentliche Zielverteilung schneller zu beproben.

Besondere Aufmerksamkeit nach vollendeter BI-Analyse gilt der Konvergenzdiagnostik. Nach dem Start einer Kette sinken die Likelihoodwerte in der Regel rasch. In der frühen Phase des Laufes sind die gesammelten Bäume noch stark vom Startpunkt beeinflusst und

werden daher als „Burnin“ verworfen. Der Konsensusbaum wird nur aus Bäumen der stabilen Phase errechnet, in der die Kette mit der Zielverteilung konvergiert. MrBayes bietet zur Konvergenz-Diagnose nur den „Overlay-plot“ und den „Potential-scale-reduction-factor“ (PSRF) an. Aussagekräftiger ist die Diagnose mit dem Programm Tracer 1.5.0 (Rambaut & Drummont 2007), das unter anderem die „Effective-sample-sizes“ testet. Ein weiterer Ansatz ist die Berechnung der Standardabweichung für die „Split-frequencies“. Diese Option ist in das Programm PhyloBayes integriert.

Verwendete Einstellungen und Parameter bayesianischer Analysen finden sich jeweils zu den entsprechenden Abbildungen.

#### **2.5.4 Phylogeographie**

Die Phylogeographie umfasst ein Forschungsfeld in der Schnittstelle zwischen Biogeographie, Populationsgenetik und Phylogenetik. Sie analysiert und beschreibt geographische Verbreitungsmuster von genealogischen Linien. Konzeptionell beleuchtet die Phylogeographie „Non-equilibrium“-Aspekte der Populationsstruktur wie genetische Drift, Genfluss und natürliche Selektion in Verbindung mit historischen Genealogien. Der Begriff Phylogeographie wurde von Avise et al. (1987) eingeführt. Grundlage phylogeographischer Analysen ist die genetische Variabilität, gemessen als Allel- oder Haplotypenfrequenz.

In der Phylogeographie sind in jüngerer Zeit rapide Fortschritte von rein deskriptiven Analysen hin zu A-priori-Testverfahren gemacht worden (Knowles 2004). Besonderer Popularität haben sich Haplotypennetzwerke erfreut, darunter insbesondere die Nested-Clade-Analysis (NCA) von Templeton (1998), weil sie für die Berechnung phylogeographischer Szenarien ohne A-priori-Annahmen zu historischen Ereignissen auskommt. Neben der Rekonstruktion der evolutionären Geschichte können mit Hilfe der NCA Aussagen zur historischen Populationsstruktur getroffen werden und Fragmentation, Kolonisation und Arealausbreitung einer Spezies rekonstruiert werden.

Ein berechtigter Nachteil der NCA besteht darin, dass die phylogeographische Inferenz nicht auf statistischen Modellen basiert. Demzufolge kann die Güte einer evolutionären Hypothese auch nicht statistisch getestet werden (Panchal & Beaumont 2007).

Jüngste Fortschritte im Bereich der „Landscape-genetics“ und „Coalescent-theory“ läuten für die Phylogeographie ein neues Zeitalter ein. Erkenntnisse aus der „landscape genetics“ ermöglichen es, auf kleinräumiger Ebene die Auswirkung lokaler ökologischer Faktoren auf Genfluss und Populationsstruktur zu untersuchen (z.B. Manel et al. 2003, Storfer et al. 2007). Auf großräumiger Ebene werden Erkenntnisse aus der „Coalescent-theory“ genutzt, um beispielsweise alternative Szenarien der Populations-Ausbreitung und Besiedelung zu untersuchen (Currat et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Programm Phylomapper (Lemmon & Moriarty Lemmon 2008) benutzt, um die Phylogeographie der Gattungen *Montivipera* und *Macrovipera* zu rekonstruieren. Eingebettet in einen statistischen Rahmen ermöglicht es, A-priori-Hypothesen zu testen und die phylogeographische Geschichte zu rekonstruieren.

Unter gegebenem Stammbaum und in der Annahme, dass sich Individuen kontinuierlich verbreiten, berechnet das Programm den geographischen Ursprung der „Most-recent-common-ancestors“ (interne Knoten) bekannter Haplotypen.

Die phylogeographischen Analysen basieren auf einer bayesianischen mt-Genealogie des konkatenierten Datensatzes 2566. In einem ersten Schritt wurde der Zusammenhang zwischen geographischer und genetischer Distanz getestet. Das Vorhandensein einer phylogeographischen Struktur hängt von der Korrelation zwischen phylogenetischer und geographischer Distanz ab. In einem „Randomization-Test“ wurde untersucht, ob der phylogeographische Zusammenhang signifikant von der Nullhypothese (keine Korrelation zwischen geographischer und genetischer Distanz) abweicht.

Vor der Berechnung der geographischen Koordinaten wurde das Phylogramm mit dem „Nonparametric-Rate-Smoothing“ (repsmooth=1000) in ein ultrametrisches Chronogramm umgewandelt. Für die Kladen im Fokus der jeweiligen Analyse wurde die Anzahl der „Dispersal-classes“ erhöht (*Macrovipera* 3, *xanthina*-Gruppe 3, *raddei*-Gruppe 2). Die Berechnungen der „Maximum-likelihood-locations“ interner Knoten wurden mit 1000 Replicates optimiert.

Die Likelihood-Oberflächen des geographischen Ursprungs von *Macrovipera lebetina*, *Montivipera xanthina* (s.l.) und *M. raddei* (s.l.) wurden in einem „Likelihood-ratio-test“ in 10%igen Konfidenz-Intervall-Abstufungen berechnet.

### 2.5.5 Kalibrierung einer molekularen Uhr

Zuckerkandl und Pauling legten mit ihren Untersuchungen (1962, 1965) zur Evolutionsrate von Proteinen den Grundstein zur Annahme einer molekularen Uhr. Nach ihrer Hypothese ist die Substitutionsrate in einem Protein konstant über die Zeit und folgt somit dem Rhythmus einer molekularen Uhr. Der Grad der Divergenz zwischen Sequenzen verschiedener phylogenetischer Abstammungslinien verändert sich unter dieser Annahme proportional zur Zeit. Nach dem Konzept der neutralen Evolution (Kimura 1968, 1983) sind die meisten Substitutionen weder von Vorteil noch von Nachteil und damit ein rein stochastischer Prozess mit gleichbleibenden Raten im Genom. Trotz des vielversprechenden Beginnes konnte sich das Konzept einer universellen, strikten molekularen Uhr nicht durchsetzen (Li 1993, Ayala 1997, Bromham & Penny 2003, Kumar 2005). Es herrscht nunmehr eine breite Akzeptanz darüber, dass Nukleotid- und Aminosäuresubstitutionen nicht mit universell konstanter Rate zwischen evolutionären

Linien stattfinden. Inzwischen werden die Faktoren, die zur Fixierung von Mutationen führen, besser verstanden. So sind etwa Populationsgröße, Selektion, Generationszeiten, Metabolismus, DNA-Reparaturmechanismen und genetische Drift entscheidende Einflussgrößen der Mutationsraten (z.B. Page & Holmes 2001). Im Ergebnis haben manche Stammeslinien daher höhere Substitutionsraten als andere, sogenannte „Lineage-effects“. Spezielle Tests, wie der „Relative-Rate-Test“ oder der „Likelihood-Ratio-Test“, ermöglichen den Nachweis von Ratenunterschieden zwischen verschiedenen Linien. Ergeben sich signifikante Ratenunterschiede im Baum, ist von strikten molekularen Uhren, die nur eine globale Rate im Baum zulassen, abzusehen. Neuere Ansätze der molekularen Datierung verfolgen realistischere Modelle der Sequenzevolution und erlauben Ratenunterschiede zwischen verschiedenen evolutionären Linien („Among-lineage-variation“). Sogenannte lokale Uhren („Local-clocks“) wurden von Rambaut & Bromham (1998) und Yoder & Yang (2000) vorgestellt und erlauben unterschiedliche Raten im phylogenetischen Baum, wobei die Vorzüge der klassischen molekularen Uhr beibehalten werden. Ein noch flexibleres Konzept der gelockerten („Relaxed-clocks“) molekularen Uhren wurde von Sanderson (1997, 2002) und Thorne et al. (1998) eingeführt. Relaxierte Uhren zeichnen sich zwar durch eine zeitliche Komponente der Sequenzevolution aus, die jedoch nicht durch den gesamten Baum konstant ist. Jüngste Entwicklungen der Bayesian-Markov-Chain-Monte-Carlo (BMCMC) „Relaxed-clock“-Modelle erlauben es sogar, die Raten unterschiedlichen Verteilungen anzupassen. Über die Verteilungen lässt sich modellieren, an welcher Stelle des Baumes die Ratenunterschiede auftreten. Während die Exponential-Verteilung annimmt, Ratenunterschiede treten an internen Knoten auf, modelliert die Lognormal-Verteilung Ratenunterschiede entlang der Äste.

Relaxierte Uhren ziehen zudem Autokorrelation in Betracht und erlauben, dass Raten selbst evolvieren können. Hohe Raten der Vorfahren bedingen tendenziell hohe Raten bei den Nachfahren. Entsprechendes gilt für niedrige Raten. Große Ratenfrequenzunterschiede in benachbarten Zweigen des Baumes werden durch „Rate-smoothing“ (Sanderson 1997) oder „Penalized-likelihood“ (Sanderson 2002) minimiert. Das Problem der Ratenermittlung ist bei Thorne et al. (1998) in ein Bayesian-Markov-Chain-Monte-Carlo (BMCMC)-Framework eingebettet.

Einen großen Vorteil der gelockerten molekularen Methoden bietet der flexiblere Umgang mit multipler Kalibrierung (z.B. Graur & Martin 2004, Ho et al. 2005, Ho 2007). Um molekulare Phylogenien zeitlich zu skalieren, sind paläontologische oder geologische Befunde nötig, weil die reine Sequenzinformation nicht zur Berechnung des absoluten Alters ausreicht. Allerdings setzt die richtige Wahl interner Kalibrierungspunkte einige A-priori-Kenntnisse über die Verwandtschaftsbeziehungen der zu untersuchenden Organismengruppe voraus. Paläontologische und geologische Befunde sind nicht selten mit

erheblicher Ungenauigkeit behaftet. Fossile Überlieferungen sind entweder unvollständig oder lassen sich nicht exakt datieren. Grundsätzlich kann ein Fossilnachweis nur für die Schätzung des Minimumalters einer Organismengruppe herangezogen werden und darf nicht als Nachweis für ein Maximumalter gewertet werden (z.B. Benton & Ayala 2003). Die Auswahl fossiler Kalibrierungspunkte sollte daher einer besonders kritischen Prüfung standhalten. In der Regel stellt es sich als ratsam heraus, molekulare Phylogenien durch möglichst zahlreiche Kalibrierungspunkte zu eichen. Dennoch schützt die bloße Menge der Kalibrierungspunkte nicht vor Verzerrungen, wenn die Kalibrierungspunkte nicht sorgfältig gewählt wurden. Eine Reihe verschiedener Kalibrierungstechniken ist entwickelt worden, um die zeitliche Information von Fossilfunden oder biogeographischen Ereignissen adäquat zu nutzen. Repräsentiert ein Fossil den direkten Vorfahren zweier rezenter Linien, kann es zur Punktkalibrierung verwendet werden (z.B. Simon et al. 2009). Das Auftreten eines Taxons in der fossilen Überlieferung kann auch mit gleicher Wahrscheinlichkeit über eine breitere Zeitspanne zwischen Maximum-Minimum-Grenzen eingeschränkt werden. Dabei können die Grenzen so gesetzt werden, dass die Wahrscheinlichkeit außerhalb des Zeitintervalls gleich Null ist („Hard-bounds“) (Hedges & Kumar 2004), oder als weiche Grenzen („Soft-bounds“) mit abnehmender Wahrscheinlichkeit auch das Auftreten des Fossils außerhalb der Grenzen erlaubt (Yang & Rannala 2006). In Abwesenheit weiterer Zeitmarken führt die Verwendung alleiniger Minimumgrenzen zur Überschätzung interner Knotenalter (Hugall et al. 2007). Ein fundamentales Problem von Maximumgrenzen ist, dass die Abwesenheit eines Nachweises keinen Nachweis für die Abwesenheit einer Linie liefert. Es liegt also in der Natur des Fossils, dass sich Altersschätzungen besonders realistisch durch asymmetrische Wahrscheinlichkeitsverteilungen modellieren lassen. Drummont et al. (2006) skizzieren eine Reihe von parametrischen Wahrscheinlichkeitsverteilungen für die Kalibrierung von Knoten, wie die normale, lognormale, exponentiale und uniforme Verteilung, die bereits als „Tree-priors“ in bayesianischen „Relaxed-clock“-Modellen des Programms BEAST (Drummont & Rambout 2007) integriert sind. Mithilfe der Standardabweichung lässt sich die Gestalt der Verteilungen dem paläontologischen Kenntnisstand anpassen. Die detailreichen Einstellungsmöglichkeiten des Programmes suggerieren jedoch eine illusorische Präzision, die eigentlich nur durch lückenlose Fossilüberlieferungen erreicht werden kann.

Für die „Relaxed-clock“-Analysen wurden die Bayesian-Inference-Programme PhyloBayes und BEAST mit Markov-Monte-Carlo-Chain-Samplern (MCMC) verwendet.

- A) Divergenzzeiten für die Kladogenese proteincodierender mt-Gene (Datensatz 3542) wurden mit dem Programm PhyloBayes 3.2d (Lartillot et al. 2007) berechnet. Unter Verwendung des CAT-Poisson-Modells sammelten zwei unabhängige MCMC-Ketten

für mindestens 7600 Generationen. In die Stichprobe der Posterior-Verteilung wurden nur Bäume aus der stationären Phase der Ketten aufgenommen, alle anderen wurden als „Burn-in“ verworfen. Die Evolution der „Log-likelihoods“ wurden als Indiz für das Erreichen der stationären Phase genutzt. Zudem wurde die Frequenz der Bipartitionen zwischen beiden unabhängigen MCMC-Läufen zur Konvergenzanalyse berechnet. PhyloBayes bietet die Möglichkeit, die Datierung unter verschiedenen alternativen relaxierten Modellen und Priors durchzuführen. So verglich ich die relaxierten Modelle „Strict“, „Log-normal“ (Thorne et al. 1998), „White-noise“ (Lepage et al. 2007), und „Uncorrelated-gamma-multipliers“ (Drummond et al. 2006). Als „Tree-priors“ für die Fossilkalibrierung verwendete ich „Hard-“ versus „Soft-bounds“ und berechnete die Divergenzzeiten sowohl unter „Birth-death“ (Yang & Rannala 2006) als auch unter uniformen Priors.

Für die Berechnung der Chronogramme sammelte eine Kette für mindestens 8000 Generationen. Die ersten 1000 Bäume wurden als „Burn-in“ verworfen und aus dem verbleibenden Pool wurde jeder zweite Baum zur Erstellung des Konsensusbaumes verwendet.

Über die verwendeten Kalibrierungspunkte und Zeitintervalle gibt Tabelle 11 Auskunft. Kalibrierungspunkte wurden über „Maximum-Minimum-bounds“ mit uniformer Wahrscheinlichkeitsverteilung modelliert. Die Innengruppe des Chronogrammes wurde mit Hilfe des Krallenfrosches *Xenopus laevis* gewurzelt. Das Alter der Wurzel entspricht dem Split zwischen Reptiliomorpha und Batrachomorpha mit einem Mittelwert von 340,25 Mio. Jahren (vergl. Benton & Donoghue 2007), angepasst über eine Normalverteilung.

- B) Für die Berechnung der Divergenzzeiten des zweiten Datensatzes (5434) wurde mit dem Programm BEAST 1.5.4 (Drummond & Rambaut 2007) ebenfalls ein bayesianischer MCMC-Algorithmus verwendet. Der Datensatz umfasst nahezu alle repräsentativen Taxa paläarktischer Viperinae. Zwei mitochondriale Gene wurden mit zwei Kerngenen zu einem Supergen mit 5434 Alignmentpositionen konkateniert. Eine Partitionierung wurde nicht vorgenommen, weil für die Sequenzen beider Genome das gleiche Evolutionsmodell (GTR+G+I) zur Distanzkorrektur ermittelt wurde.

Zwei parallele Läufe sammelten über 10 Mio. Generationen jeden 100sten Baum. Speziation und Aussterbeprozesse der Kladogenese wurden über den Birth-death-Prozess modelliert. Topologische Zwänge wurden nicht gesetzt. Die MCMC-Verteilung und die Konvergenz der Ketten wurde mit dem Programm Tracer 1.5.0 (Rambaut & Drummond 2007) analysiert. Die ESS („Effective-sample-size“) aller Parameter lag, wie von den Autoren empfohlen, >200. Anschließend wurden die ersten 25% der Bäume als „Burn-in“ verworfen und mit den verbleibenden 75% ein



Maximum-Clade-Credibility-Konsensusbaum in TreeAnnotator 1.5.4 (Drummond & Rambaut 2007) berechnet, der in FigTree (Rambaut 2008, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) visualisiert wurde. Für die Kalibrierung verwendete ich ausschließlich sekundäre Eichpunkte, die eine hohe Übereinstimmung zu biogeographisch, tektonischen Ereignissen aufweisen. Diese sind folgende:

- 1) Der Split zwischen eurasischen und afrikanischen Viperiden wurde mit einem Mittelwert von 38,3 Mio. Jahren einer Normalverteilung und einer Standardabweichung von 2 Mio. Jahren angepasst, so dass 95% der Dichtefunktion zwischen 35,01 und 41,59 Mio. Jahre lagen.
- 2) Die Trennung zwischen *Daboia mauritanica* und *Daboia russelii* vollzog sich im Mittel vor 18,9 Mio. Jahren, nachdem die *Gomphotherium*-Landbrücke zwischen Afrika und Asien kollabierte. Die Divergenzzeit wurde einer Normalverteilung mit einer Standardabweichung von 1 Mio. Jahren angepasst. 95% der Dichtefunktion lagen zwischen 17,26 und 20,54 Mio. Jahren.
- 3) Übereinstimmend mit einer Transgression im mittleren Miozän liegt die Divergenz zwischen *Montivipera* und *Macrovipera* im Mittel bei 15,3 Mio. Jahren. Eine Normalverteilung mit Standardabweichung von 1 Mio. Jahren umspannt 95% der Dichtefunktion zwischen 13,55 bis 16,94 Mio. Jahren.
- 4) Divergenzzeiten kompletter Mitogenome datieren den Split zwischen *Montivipera raddei* und *Montivipera xanthina* auf 10,7 Mio. Jahre. Paläotektonische Evidenzen zeigen jedoch, dass der Split schon vor 14 Mio. Jahren seinen Ursprung hätte haben können. Die Normalverteilung wurde mit einer Standardabweichung von 2 Mio. so modelliert dass, 95% der Dichtefunktion zwischen 7,41 - 13,99 Mio. Jahren liegen.
- 5) *Macrovipera lebetina obtusa* ist von *Macrovipera lebetina turanica* vor 4,3 Mio. Jahren separiert worden. Dafür existiert kein direkter tektonischer Beweis. Mediterrane Populationen der Levanteotter, die basal zu dem genannten Split positioniert sind, wurden jedoch zweifelsfrei vor 5,3 Mio. Jahren durch die Flutung des Mediterrans von allen übrigen Linien getrennt. Folglich muss der Split *obtusa-turanica* jünger sein. Die Standardabweichung von 1 Mio. Jahren deckt 95% der Dichtefunktion zwischen 2,56 und 5,95 Mio. Jahren ab.

Tabelle 11: Verwendete Kalibrierungspunkte und Einschränkungen für die Skalierung molekularer Uhren der Datensätze 3542 und 5434. Angegeben sind die Schlüsselarten der Verzweigungspunkte und äquivalente Klade. Für die in PhyloBayes verwendeten Kalibrierungspunkte wurden Max./Min.-Grenzen bei uniformer Verteilung gesetzt, während die in BEAST verwendeten Kalibrierungspunkte einer Normalverteilung angepasst wurden. Ein negativer Wert (-1) bedeutet, dass kein Maximumalter definiert wurde. MRCA=most recent common ancestor.

Knoten (Datensatz 3542)		Äquivalente Klade	Min. Alter (MRCA)	Max. Alter (MRCA)	PhyloBayes	Quelle
<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mus/Rattus</i> Linie	11	12,3	uniform	Benton & Donoghue (2007)
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Glires</i>	61,5	100,5	uniform	Benton & Donoghue (2007)
<i>Caiman crocodilus</i>	<i>Alligator mississippiensis</i>	<i>Caiman/Alligator</i>	68	-1	uniform	Müller & Reisz (2005)
<i>Gallus gallus</i>	<i>Caiman crocodilus</i>	Aves/Ornithomimidae/Crurotarsi	235	250,4	uniform	Benton & Donoghue (2007)
<i>Mus musculus</i>	<i>Gallus gallus</i>	Sauropsida/Synapsida (Amniota)	312,3	330,4	uniform	Benton & Donoghue (2007)
<i>Caiman crocodilus</i>	<i>Iguana iguana</i>	Archosauromorpha/Lepidosauromorpha	259,7	299,8	uniform	Benton & Donoghue (2007)
<i>Sphenodon punctatus</i>	<i>Iguana iguana</i>	Rhynchocephalia/Squamata	228	-1	uniform	Sues & Olsen (1990)
<i>Thermophilis zhaoermii</i>	<i>Elaphe porphyrocephala</i>	Colubridae	33,7	-1	uniform	Rage et al. (1992)
<i>Naja naja</i>	<i>Naja mossambica</i>	afrikanische/asiatische Kobras	16	-1	uniform	Szyndlar & Rage (1990)
<i>Abronia graminea</i>	<i>Varanus salvator</i>	Anguimorpha	160	-1	uniform	Evans (2003)
Knoten (Datensatz 5434)		Äquivalente Klade	Mittelwert (MRCA)	Stabw. (MRCA)	BEAST	Quelle
afrikanische Viperinae	Eurasische Viperinae	<i>Causus-Bitis/Vipera-Montivipera-Macrovipera-Daboia</i>	38,3	2	Normalverteilung	Stümpel unpubliziert
<i>Daboia russelii</i>	<i>Daboia mauritanica</i>	<i>Daboia</i>	18,9	1	Normalverteilung	Stümpel unpubliziert
<i>Montivipera</i>	<i>Macrovipera</i>	<i>Montivipera/Macrovipera</i>	15,3	1	Normalverteilung	Stümpel unpubliziert
<i>Montivipera raddei</i>	<i>Montivipera xanthina</i>	<i>raddei-complex/xanthina-complex</i>	10,7	2	Normalverteilung	Stümpel unpubliziert
<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	<i>M. lebetina obtusa/M. lebetina turanica</i>	4,3	1	Normalverteilung	Stümpel unpubliziert

### 2.5.6 Dispersal-Vicariance-Analyse

Dispersal-Vicariance-Analyse (DIVA) (Ronquist 1996, 1997) ist eine Methode zur Rekonstruktion biogeographischer Ereignisse. Das Programm DIVA rekonstruiert ancestrale Verbreitungsmuster entlang einer Phylogenie durch Optimierung einer dreidimensionalen Kostenmatrix, in der Extinktion und Verbreitung mehr Kosten verursachen als Vikarianz (Ronquist 1997, Lamm & Redelings 2009). DIVA berücksichtigt keine Arealgrößen oder biogeographische Verbreitungsmuster bei der Rekonstruktion der ancestralen Areale. Die Methode ist daher geeignet, die Verbreitungsgeschichte von Organismen auch ohne generelle Hypothesen zur Biogeographie zu rekonstruieren. Die Methode ist auch anwendbar, wenn Beziehungen zwischen Arealen netzwerkartig anstatt hierarchisch sind.

Der Algorithmus der DIVA-Version 1.1 (Ronquist 1996) entwickelt die Hypothese zu ancestralen Arealen entlang einer festen Topologie, die keine alternativen Verzweigungsmuster erlaubt (Nylander et al. 2008). Eine weitere Unschärfe der Analyse ergibt sich durch die Optimierung ancestraler Areale, die bei multiplen, ähnlich guten Lösungen in multiplen Arealen basaler Knoten resultiert (Ronquist 1997, Nylander et al. 2008). Um die Probleme zu überwinden, verwendete ich nichtparametrische empirische bayesianische Ansätze der neueren Programmversionen (Nylander et al. 2008, Antonelli et al. 2009). Harris & Xiang (2009) schlugen einen alternativen Ansatz zu Bayes-Diva vor. Yu et al. (2010) implementierten die Methoden von Nylander et al. (2008) und Harris & Xiang (2009) in Kombination mit statistischen Testverfahren in der Programmversion S-DIVA. Das Programm berücksichtigt Frequenzen alternativer ancestraler Verbreitungsareale in der Phylogenie und misst Unterstützungswerte für Knoten.

Für die Dispersal-Vicariance-Analyse mit dem Programm S-Diva wurde ein BI-Baum mit 11 OTUs (Operational-Taxonomic-Unit) mit dem Programm PhyloBayes 3.2d (Lartillot et al. 2009) berechnet. Die DIVA-Analyse wurden mit 2000 BI-Bäumen, von denen die ersten 50% als „Burn-in“ verworfen wurden, durchgeführt. Alle Taxa wurden mindestens einem der Verbreitungsgebiete A=Afrika, E=Europa, N=Naher und Mittlerer Osten, K=Kleinasien, I=Indien zugeordnet.

### 2.5.7. Historische Populationsdemographie

Um Signaturen historischer Populationsdemographie aufzuspüren, wurden Mismatch-Verteilungen anatolischer Berggottern mit dem Programm DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009) generiert. Eingipflige Verteilungen lassen auf eine stark anwachsende, panmiktische Population schließen, die ihr Areal plötzlich ausgeweitet hat (Slatkin & Hudson 1991, Rogers & Harpending 1992). Im Gegensatz dazu kennzeichnen mehrgipflige Verteilungen

stabile strukturierte oder schrumpfende Populationen (Excoffier et al. 1992, Rogers & Harpending 1992, Rogers et al. 1996, Excoffier & Schneider 1999).

Die Abweichung der Mismatch-Verteilungen von der Nullverteilung einer konstanten Population wurde durch Berechnung von  $F_s$  (1997)  $F_s$ , Ramos-Onsins und Rozas (2002)  $R_2$  und Harpendings (1994) Raggedness Index  $R_i$  bestimmt. Große negative Werte von  $F_s$  und kleine positive Werte von  $R_2$  sind Indikatoren eines Populationswachstums. Als Signaturen eines plötzlichen Populationswachstums gelten geringe Index-Werte von  $R_i$ , wohingegen höhere Werte auf stationäre oder schrumpfende demographische Entwicklungen schließen lassen (Harpending et al. 1993, Harpending 1994).

Die statistischen Tests wurden in DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009) unter Annahme einer konstanten Population ohne Rekombinationsereignisse (haploide mt Gene) durchgeführt. Signifikanztests (Abweichung von der Nullhypothese) erfolgten mit 10.000 Coalescent-Simulationen einer neutral evolvierenden Population.

Für die Darstellung demographischer Veränderungen in der Zeit, wurde die effektive Populationsgröße ( $N_e$ ) mit Bayesian-Skyline-Plot (BSP, Drummond et al. 2005) modelliert. Der Algorithmus ist in das Programm BEAST (Drummond & Rambaut 2007) integriert. Die Methode bedarf keiner zuvor definierten demographischen Modelle und bietet die Möglichkeit, phylogenetische und Coalescent basierte Unsicherheiten mithilfe von Glaubwürdigkeitsintervallen darzustellen (Drummond et al. 2005).

Die Analyse wurde für vier Bergotter-Taxa durchgeführt (*xanthina*, *wagneri*, *bornmuelleri* und *bulgardaghica*). Datengrundlage bilden die mt-Gene Cytb, COI, ND5, die nach Locus partitioniert wurden. Adäquate Evolutionsmodelle wurden separat für jedes Gen über das AIC in MrModeltest 2.2 (Nylander 2004) bestimmt.

Die Evolutionsrate zur Kalibrierung der Gruppen über die Divergenzzeitberechnung ermittelt und beträgt für die Bergottern 0,0043/Mio. Jahre. Kalibrierungspunkte wurden über eine Normalverteilung mit einer Standardabweichung (Stdev) von 0,1 Mio. Jahre modelliert.

Vier Markov-Ketten (MCMC) sammelten über 300 Mio. Generationen jeden 1000sten Baum, von denen die ersten 25% als Burnin verworfen wurden. Die Posterior-Verteilung und die effektive Stichprobe des Laufes wurde mit dem Programm Tracer v. 1.4 (Rambaut & Drummond 2007) untersucht.

### 3 Phylogenie der Viperinae auf Basis vollständiger mt-Genome

#### 3.1 Einleitung

Schlangen gehören innerhalb der Squamaten zu der Großgruppe der Scleroglossa, die sich dadurch auszeichnen, dass sie zum Beuteerwerb Zähne und Kiefer benutzen, während bei der Schwestergruppe, den Iguania, dafür die Zunge verwendet wird (z.B. Pough et al. 2004). Traditionell ist die systematische Stellung der Serpentes innerhalb der Squamaten unsicher (z.B. Estes et al. 1988). Auch in der jüngeren Literatur herrscht über die systematische Stellung der Schlangen Unklarheit. Molekulargenetische Studien zeigen sie auf der Basis diploider Marker als Schwestergruppe zu Anguimorpha und Iguanidae (Vidal & Hedges 2005) oder als Schwestergruppe zu Anguimorpha (Townsend et al. 2004). Haploide Marker platzieren sie dagegen als Schwestergruppe zu Acrodonta (Böhme et al. 2007) oder als Schwestergruppe zu allen übrigen Squamaten (Jiang et al. 2007). Acrodonta und Serpentes sind in mt-Phylogenen durch lange Äste gekennzeichnet. Nach vorherrschender Meinung (z.B. Albert et al. 2009) ist die Stellung der beiden Gruppen in mt-Phylogenen ein Artefakt der „Long-branch-attraction“.

Die 3000 Arten umfassenden Schlangen werden in zwei Großgruppen eingeteilt (z.B. Vidal & Hedges 2002a). Bei der ursprünglicheren der beiden Gruppen, den Scolecophidia (Leptotyphlopidae, Typhlopidae, Anomalepidae), handelt es sich um unterirdisch lebende Wülschlangen mit teilweise ursprünglichen Merkmalen, wie z.B. der kleinen unflexiblen Mundöffnung (Wallach 1998, zit. in Vidal & Hedges 2002a). Alle anderen Schlangen verfügen über „typische Schlangen-Merkmale“, wie z.B. den flexiblen Kiefer und die Fähigkeit, große Beutestücke zu verschlingen. Sie werden als Alethinophidia (moderne Schlangen) bezeichnet. Die modernen Schlangen umfassen etwa 2700 Arten, die wiederum in zwei Gruppen gegliedert werden. Unter ihnen sind die Wühl- und Riesenschlangenartigen (Henophidia), die sich durch den Besitz von Beckenrudimenten und der Bezahnung des Zwischenkiefers von der zweiten Gruppe, den Caenophidia unterscheiden. Die nattern- und vipernartigen Schlangen (Caenophidia) stellen den artenreichsten Evolutionszweig der Schlangen dar. Je nach taxonomischer Auffassung werden innerhalb der Caenophidia bis zu sieben Überfamilien unterschieden (Vidal et al. 2007).

Eigentliche Giftschlangen mit Giftdrüsen und Giftzähnen existieren nur unter den modernen Schlangen (Colubroidea) in den Familien Colubridae, Atractaspididae, Elapidae und Viperidae (z.B. Fry et al. 2006). Nach traditioneller systematischer Auffassung sind die Vipern eine Familie der Colubroidea mit zwei Unterfamilien, den Viperinae und Crotalinae. Vidal et al. (2007) heben die Vipern in den Rang einer Superfamilie Viperioidea. Die

Viperidae besiedeln alle Kontinente mit Ausnahme Australiens und der Antarktis (Pough et al. 2004). Unter ihnen sind medizinisch relevante Arten, die für die Mehrzahl der weltweiten Todesfälle durch Giftschlangenbisse verantwortlich sind (Warrell 1995). Viperiden besiedeln eine Vielzahl unterschiedlichster ökologischer Nischen (Greene 1997) und sind Modellorganismen (Shine & Bonnet 2000) für „Life-history“-Untersuchungen (z.B. Madsen & Shine 1994) und die Giftevolution (z.B. Creer et al. 2003).

Im Fokus dieses Kapitels stehen die Viperinae, die von einigen Autoren (Vidal et al. 2007) auch als eigene Familie aufgefasst werden.

Viperinae sind in ihrer Verbreitung auf Afrika und Eurasien beschränkt (Pough et al. 2004). Taxonomie und Systematik der Gattungen und Arten innerhalb der Viperinae sind kontrovers diskutiert worden (siehe auch Lenk et al. 2001, Wüster et al. 2008). Die südostasiatischen Fea-Vipern (*Azemiops*) wurden lange Zeit als basale Linie den Vipern zugerechnet (Groombridge 1986). Molekulargenetische Analysen von Kelly et al. (2003) zeigen sie in Abhängigkeit vom verwendeten Algorithmus als Schwestergruppe der Crotalinae oder als basale Linie der Viperinae. Cadle (1992), Heise et al. (1995), Wüster et al. (2008) identifizieren sie als Schwestergruppe der Crotalinae. Eine weitere Gattung mit unklarer systematischer Position sind die afrikanischen Krötenkopf-Vipern (*Causus*), die ebenfalls als basale Linie der Viperinae betrachtet wurden (Herrmann & Joger 1995, 1997) oder als Schwestergruppe aller Viperinae (Groombridge 1986).

Aufgrund unvollständiger Fossilüberlieferungen und morphologischer Konvergenzen waren die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Viperinae lange Zeit ungeklärt und Gegenstand kontroverser Hypothesen.

Die ersten molekulargenetischen Phylogenien, zunächst auf Basis von Serumalbuminen (Joger & Herrmann 1993, Herrmann et al. 1992b) und später mithilfe von Nukleotidsequenzen (Herrmann & Joger 1995, 1997, Herrmann et al. 1999, Lenk et al. 2001, Wüster et al. 2008), unterscheiden sich fundamental von den morphologischen Stammbäumen (Groombridge 1980, Ashe & Marx 1988). Während Groombridge eurasische Vipern<sup>2</sup> als monophyletische Gruppe betrachtete, stellten Ashe & Marx (1988) eine fundamentale Polyphylie fest, die auffallend diskrepant zu biogeographischen Verbreitungsmustern der eurasischen Viperinae ist.

Molekulare Untersuchungen konnten die Gegensätze nur partiell aufklären. Herrmann et al. (1999), Lenk et al. (2001) und Wüster et al. (2008) bestätigen die Monophylie der eurasischen Viperinae, ihre Stammbäume sind jedoch hinsichtlich der topologischen Struktur innerhalb der Viperinae miteinander im Konflikt.

---

<sup>2</sup> Eurasische Viperinae umfassen nach Herrmann & Joger (1997) die Gattungen *Vipera*, *Macrovipera*, *Montivipera*, *Daboia*, *Eristicophis*, *Pseudocerastes*.

Nukleotidsequenzen von Mitochondrien sind als Quelle für phylogenetische Untersuchungen etabliert (Simon et al. 2006, Galtier et al. 2009) und finden nach wie vor breite Anwendung.

Mitochondrien-Genome bieten neben der reinen Sequenzinformation eine weitere Informationsquelle für stammesgeschichtliche Rekonstruktionen. Einzigartige Strukturen in der Architektur des mt-Genoms, wie „Gene-rearrangements“ oder Sekundärstrukturen von t-RNAs, bieten eine spezielle Qualität der phylogenetischen Information. „Gene-rearrangements“ sind starke apomorphe Signale einer gemeinsamen stammesgeschichtlichen Abstammung (z.B. Pereira 2000).

Seit der Veröffentlichung des ersten vollständigen humanen mt-Genoms durch Anderson et al. (1981) sind eine Vielzahl neuer mt-Genome unterschiedlichster Tiergruppen sequenziert worden.

Die ersten Analysen vollständiger Vertebraten-mt-Genome zeigten keine Abweichungen von der bekannten Genanordnung entlang des mt-Moleküls. Daher ging die Wissenschaft davon aus, Vertebraten hätten eine hochkonservierte mt-Genom-Architektur (Pereira 2000). Im Laufe der Zeit wurden immer mehr mt-Genome bekannt, die in ihrer Genanordnung von dem bekannten Muster abwichen. Mittlerweile sind in fast jeder Vertebraten-Linie apomorphe Sonderstrukturen identifiziert worden (Meyer & Zardoya 2003).

In mehreren Squamaten-Linien wurden kleinräumige „Rearrangements“ gefunden (z.B. Kumazawa & Nishida 1995, 1999, Macey et al. 1997, Seutin et al. 1994, Janke & Árnason 1997). Kumazawa et al. (1996, 1998) und Dong & Kumazawa (2005) konnten neue mt-DNA-Arrangements in mehreren Schlangenfamilien nachweisen. So ist die t-RNA-<sup>Leu</sup> bei den untersuchten Taxa im mt-Molekül zu einer nicht homologen Position transloziert.

Kennzeichnend für Schlangen und einzigartig unter Vertebraten ist die Verdopplung der Kontrollregion (Kumazawa et al. 1996). Alle Schlangen verfügen über zwei Kontrollregionen, eine in kanonischer Position und eine zweite Kopie ist zusammen mit t-RNAs in das IQM-Cluster integriert.

Nach dem Parsimonie-Prinzip nimmt man an, dass komplexe „Gene-rearrangements“ einmalige autapomorphe Merkmale sind und nicht konvergent oder parallel in weiteren evolutionären Linien auftreten (z.B. Boore et al. 2005).

Der Vergleich vollständiger mt-Genome ist eine vielversprechende Analyseverfahren für die Rekonstruktion evolutionärer Hypothesen (Simon et al. 2006). Gen-Arrangements haben das Potential, tiefe Zweige in Phylogenien zu entschlüsseln. In einigen Fällen konnten Gen-Arrangements überzeugendere phylogenetische Hypothesen liefern als Nukleotid-Sequenzen (z.B. Boore et al. 1995, 1998).

Darüberhinaus bieten vollständige mt-Genome wegen ihrer Größe die Möglichkeit, ihre Nukleotid-Information in die korrespondierende Aminosäuresequenzen zu übersetzen und trotz der Reduzierung von Charakteren (drei Basen → eine Aminosäure) genügend Information für die Rekonstruktion phylogenetischer Hypothesen anzubieten. Aminosäuresequenzen unterliegen zudem einer geringeren Sättigung. Dong & Kumazawa 2005, Cook et al. 2005, Hassanin 2006 verwendeten bereits erfolgreich konkatenierte Protein codierende mt-Gene für phylogenetische Analysen. Die 16 Kilobasen großen Moleküle gewährleisteten nach Russo et al. (1996) stabilere Phylogenien als kurze Genfragmente.

Mit der De-novo-Sequenzierung neun vollständiger Vipern-Mitogenome waren die folgenden Fragestellungen verbunden:

- 1) Wie sind die phylogenetischen Beziehungen eurasischer Viperinae auf Basis vollständiger mt-Genome und lässt sich die Position der Gattung *Vipera* validieren?
- 2) Sind die Gattungen *Macrovipera*, *Montivipera*, *Daboia* und *Vipera* durch autapomorphe „Rearrangements“ oder Sequenz-Muster gekennzeichnet?
- 3) Sind diese als phylogenetische Marker geeignet, monophyletische Linien zu identifizieren?

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Sequenz- und Sättigungsanalyse

Elf proteincodierende Gene (ND1, ND2, COX1, COX2, ATP6, COX3, ND3, ND4L, ND4, ND5, Cytb) des L-Stranges wurden von 50 mt-Genomen zu einem Alignment mit 10.623 bp konkateniert. Das DNA-Alignment enthält 2535 konstante Charaktere, 645 variable uninformative Merkmale und 7173 Parsimonie-informative Merkmale.

Abbildung 4 zeigt die unkorrigierten genetischen Distanzen von 11 homologen Genen eurasischer Viperinae. Die geringste genetische Variabilität unter den 11 proteincodierenden Genen findet sich in den Genen COX1 und COX2, während die Gene ND4L und ATP6 die höchste Anzahl an Substitutionen aufweisen.

Deutlich zu sehen sind die unterschiedlichen Substitutionsraten zwischen den drei Codon-Positionen.

Eine Punktmutation an der dritten Codon-Position resultiert nur zu 30% in einer Änderung der Aminosäure. Die Substitutionsrate ist an der „Wobble“-Position deswegen um den Faktor 8 höher als an der zweiten Position, bei der jede Mutation eine Änderung der korrespondierenden Aminosäure nach sich zieht. Eine Mutation an der ersten Position führt



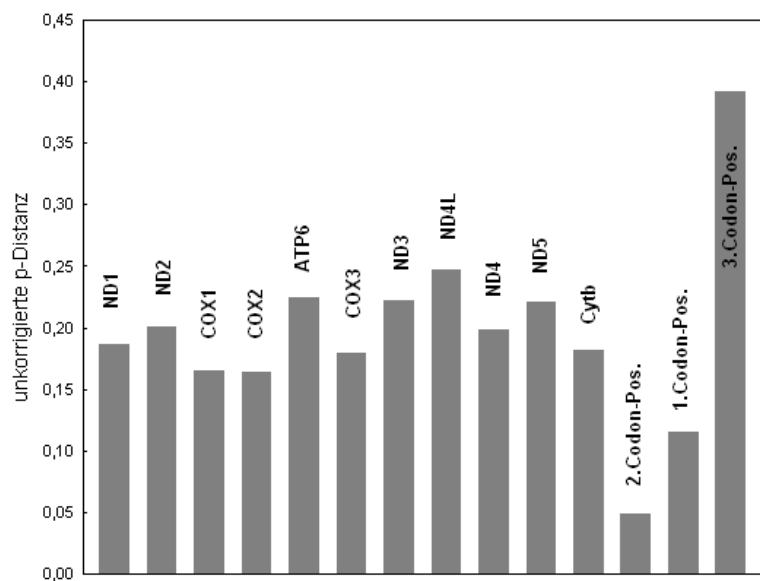


Abbildung 4: Maximale unkorrigierte genetische Distanzen von 11 protein-codierenden mt-Genen sowie die p-Distanzen der einzelnen Codon-Positionen des konkatenierten Datensatzes 3542. Verwendet wurden die sequenzierten mt-Genome von *Daboia mauritanica*, *Macrovipera l. obtusa*, *M. l. turanica*, *Montivipera xanthina*, *M. wagneri*, *M. r. kurdistanica*, *Vipera ammodytes*, *V. b. bosniensis*, *V. orlovii* und eine Gendatenbanksequenz von *Daboia russelii* (gi 209886939).

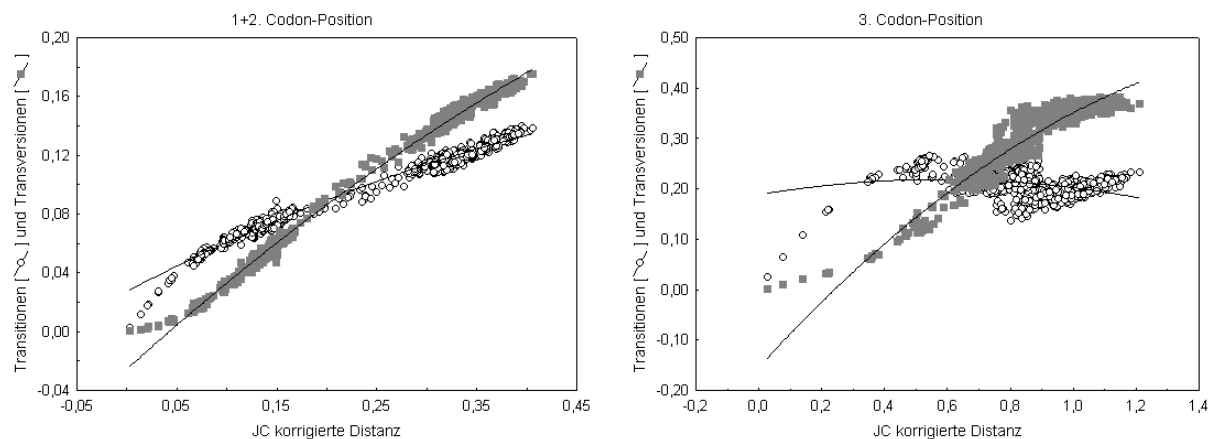


Abbildung 5: Graphische Sättigungsanalyse generiert mit DAMBE (Xia & Xie 2001) für 52 OTUs der untersuchten mt-Gene ND1, ND2, COX1, COX2, ATP6, COX3, ND3, ND4L, ND4, ND5, Cytb (Datensatz 3542, 10626 pb). Anzahl beobachteter Transitionen (Ts) und Transversionen (Tv) sind gegen die korrigierte genetische Jukes-Cantor Distanz (JC) der paarweise verglichenen Sequenzen aufgetragen. Linke Seite: beobachtete Ts und Tv für die erste und zweite Codon-Position. Rechte Seite: beobachtete Ts und Tv für die dritte Codon-Position. Im untersuchten Datensatz sind alle Codon-Positionen gesättigt, weil mit ansteigender genetischer Distanz Tv gleich häufig oder häufiger als Ts stattfinden.

hingegen zu 96% zu einer Änderung der Aminosäure. Die erste Codon-Position hat eine 2,4fach erhöhte Mutationsrate gegenüber der hoch konservierten zweiten Position. Sättigungseffekte wurden für alle 52 OTUs des konkatenierten DNA-Alignments bestimmt. Abbildung 5 zeigt das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen aufgetragen gegen die korrigierte genetische Jukes-Cantor Distanz. Das konkatenierte Alignment zeigt unter dem Jukes-Cantor-Modell zur Distanzkorrektur in beiden Codon-Partitionen Sättigungseffekte. Transversionen nehmen mit steigender genetischer Distanz deutlich zu und übertreffen die Transitionen zahlenmäßig.

Die graphischen Ergebnisse der Sättigungsanalyse werden teilweise auch von dem „Information-entropy-based-Index“ untermauert. Für die untersuchten mt-Gene wurden in den ersten beiden Codon-Positionen keine Sättigungseffekte festgestellt ( $I_{ss} < I_{ss,c}$ ,  $p < 0,001$ , für 4, 8, 16, 32 OTUs). Für die dritte Codon-Position zeigt der „Information-entropy-based-Index“ Sättigungseffekte an.

Der resultierende  $I_{ss}$  -Wert ist für 32 OTUs marginal kleiner als der  $I_{ss,cSym}$  ( $p = 0,0216$ ). Für asymmetrische Topologien ist der  $I_{ss,aSym}$  mit 0,055 signifikant ( $p < 0,001$ ) kleiner als der  $I_{ss}$  -Wert mit 0,792.

Die Testergebnisse beweisen, dass die dritte Codon-Position der mt-Gene kein brauchbares Signal liefert, wenn die Phylogenie, wie im vorliegend Fall (Abbildung 6), asymmetrisch ist. Für die Rekonstruktion der Phylogenie wurden daher Aminosäuresequenzen verwendet.

### 3.2.2 Bayesianische Phylogenie

Die BI-Phylogenie in Abbildung 6 zeigt einen vollständig dichotom verzweigten Baum. Die Mehrzahl aller Knoten hat robuste Posterior-Probabilities, die im Mittel bei 0,98 liegen. 96% aller Knoten haben Posterior-Probabilities  $\geq 0,95$ .

Der Stammbaum wurde mit *Xenopus laevis* gewurzelt und zeigt Mammalia als Schwestergruppe der Archosauromorpha und Lepidosaurier. Verzweigungsmuster innerhalb der Archosauromorpha sind durch maximale Posterior-Probabilities abgesichert. *Chelonia mydas* steht als Vertreter der Testudines basal zu Aves und Crocodylia.

Brückenechsen sind mit hoher statistischer Unterstützung (PP 0,95) die Schwestergruppe der Squamaten. Die Monophylien der Gekkota, Iguanidae, Lacertidae/Amphisbaenidae, Acrodonta und Serpentes sind durch hohe PP-Werte  $\geq 0,98$  statistisch abgesichert. Innerhalb der Squamaten stellen die Gekkota den ersten basalen Zweig dar. Iguanidae, Lacertidae und Amphisbaenidae gehen auf einen gemeinsamen Stammlinienvertreter zurück (PP 0,98). Nicht abgesichert ist dagegen die Klade mit Anguimorpha, Acrodonta und Serpentes (PP  $< 0,50$ ). Die Zweige von Acrodonta und Serpentes sind durch besonders

lange Äste gekennzeichnet. Möglicherweise ist das Schwesterverhältnis der beiden Gruppen trotz hoher Posterior-Probabilities ein Artefakt der „Long-branch-attraction“.

Die Subklade der Serpentes bestätigt die traditionelle Division in die drei Großgruppen Scolecophidia, Henophidia und Caenophidia. Das Verzweigungsmuster des Baumes ist durch hohe Posterior-Probabilities statistisch abgesichert. Diese liegen im Mittel bei 0,995.

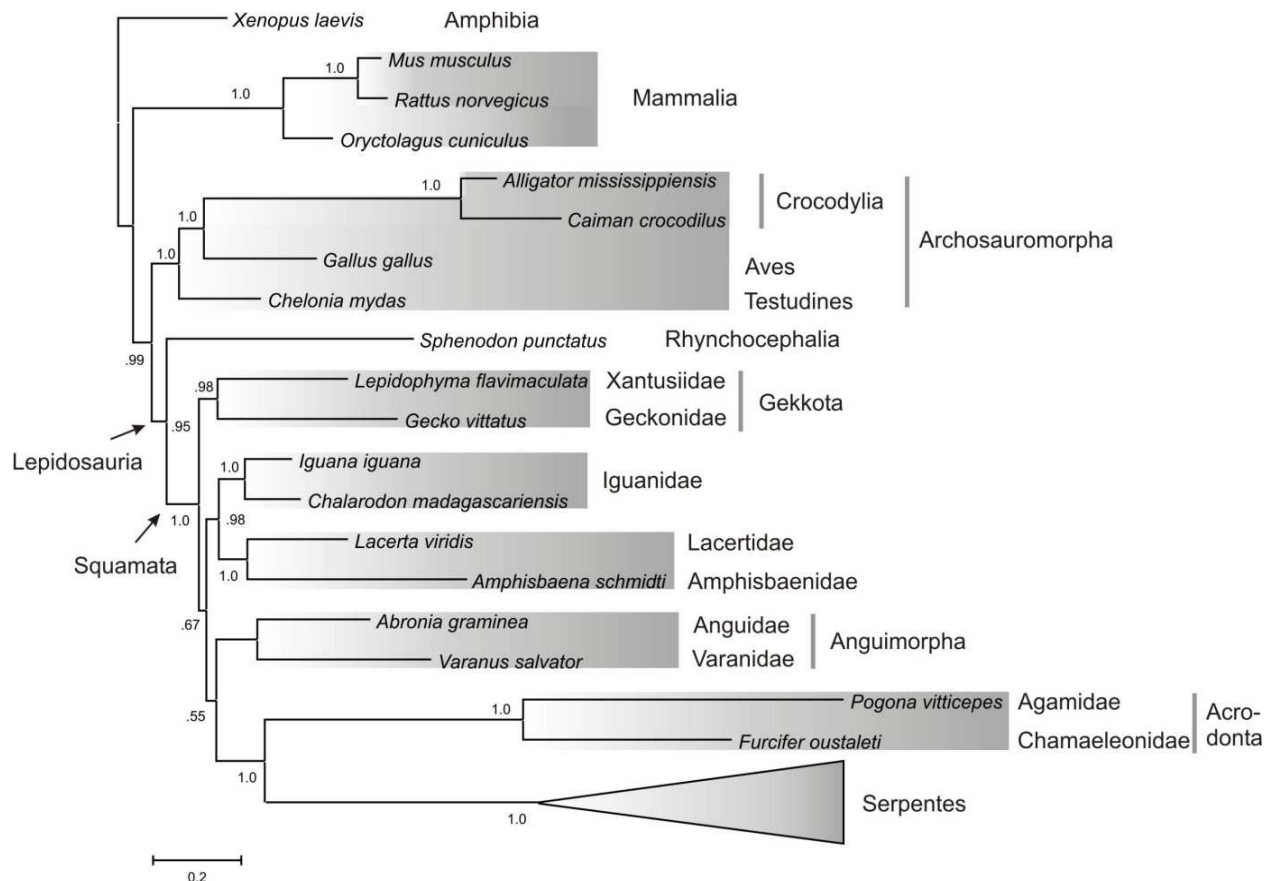


Abbildung 6: Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Amniota (Original). Die bayesianische Analyse basiert auf den Aminosäuresequenzen von 11 verketteten proteincodierenden Genen (Datensatz 3542) des mitochondrialen L-Stranges (ohne ATP8) mit insgesamt 3455 Alignmentpositionen (entspricht 10.365 Nukleotiden). Hypervariable Sequenzpositionen wurden zuvor mit dem Programm trimAl (Capella-Gutiérrez et al. 2009) analysiert und von nachfolgenden Berechnungen ausgeschlossen. Den 50%-majority-rule-Konsensusbaum berechnete ich unter Verwendung des CAT-Poisson-Modells mit dem Programm PhyloBayes3.2d (Lartillot et al. 2007). Die Zahlen der Knoten zeigen Posterior-Probabilities. Zwei unabhängige Monte-Carlo-Markov-Ketten (MCMC) beprobten für mindestens 7600 Generationen. In die Stichprobe der Posterior-Verteilung wurden nur Bäume aus der stationären Phase der Ketten aufgenommen, alle anderen wurden als „Burnin“ verworfen. Die Evolution der Log-likelihoods wurde als Indiz für das Erreichen der stationären Phase genutzt. Zudem wurde die Frequenz der Bipartitionen zwischen beiden unabhängigen MCMC-Läufen zur Konvergenzanalyse berechnet. Gewurzelt wurde der Baum mithilfe des Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Serpentes sind hier zur besseren Übersicht als kollabierte Klade dargestellt und in der nachfolgenden Abbildung im Detail gezeigt.

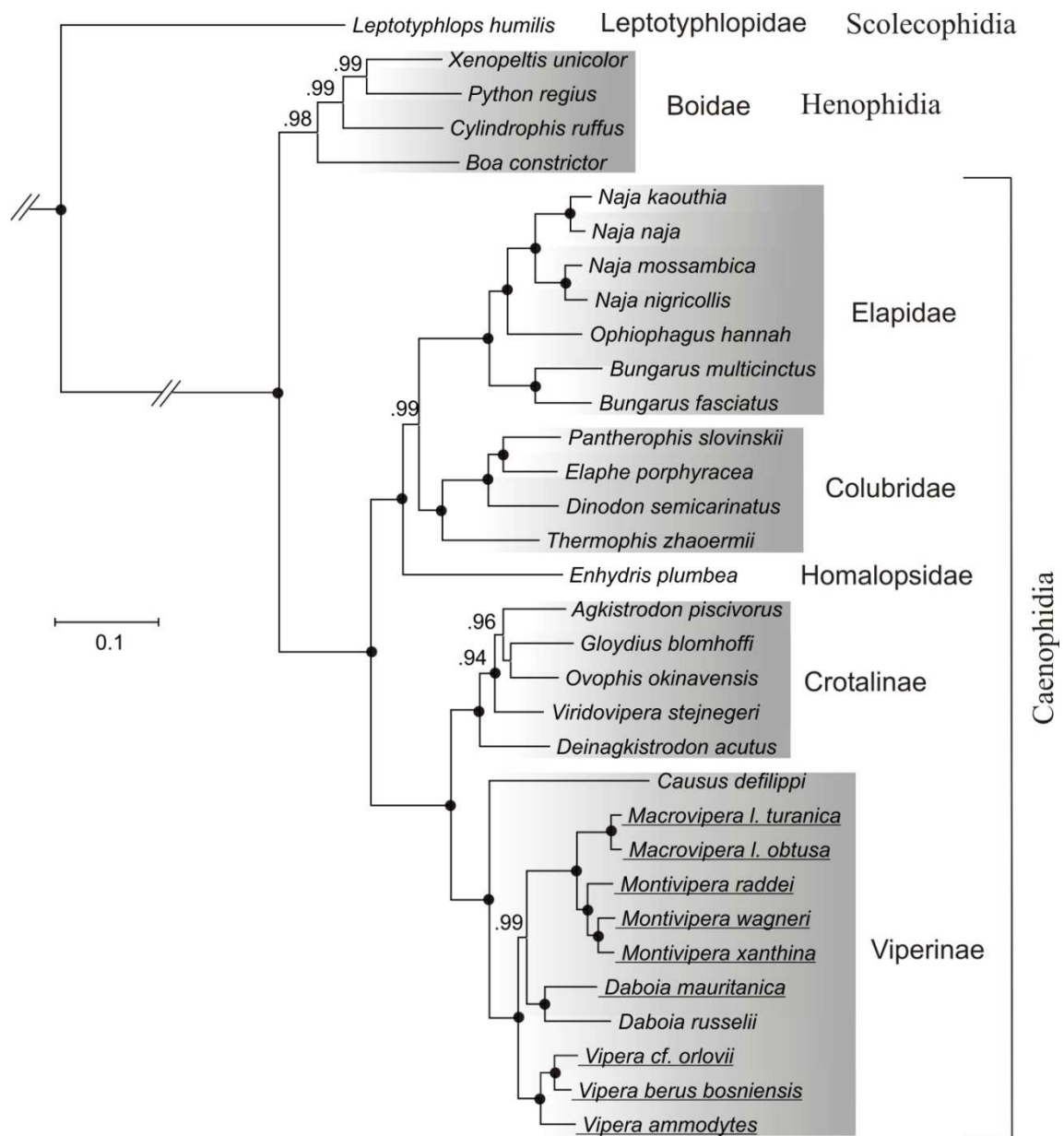


Abbildung 7: Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Subklade Serpentes (Datensatz 3542). Details zur Berechnung siehe Abbildung 6. Posteriorwahrscheinlichkeiten von 1.0 sind durch schwarze Kreise symbolisiert, geringere Unterstützungswerte sind direkt angegeben. Die Topologie des Stammbaums zeigt übereinstimmend mit der Systematik die drei Großgruppen der Schlangen mit *Leptotyphlops* als Vertreter der Scolecophidia basal zu Haenophidia und Caenophidia. Die Viperinae sind die Schwestergruppe der alt- und neuweltlichen Crotalinae. Die Phylogenie innerhalb der Viperinae ist durch maximale Posterior-Probabilities untermauert. Die bayesianische Analyse belegt, dass die europäischen "Kleinvipern" der Gattung *Vipera* (sensu lato) zweifelsfrei die Schwestergruppe der asiatischen "Großvipern" sind und nicht wie von Wüster et al. (2008) gezeigt, als Schwesterklade zu *Daboia* innerhalb der asiatischen "Großvipern" verschachtelt sind. Neu sequenzierte Taxa sind unterstrichen. Alle anderen Sequenzne wurden der Datenbank NCBI entnommen.

Durch eine Reihe ursprünglicher Merkmale gekennzeichnet, bilden die Scolecophidia erwartungsgemäß einen basalen Zweig zu den Riesenschlangenartigen und den modernen Schlangen. Henophidia sind die Schwestergruppe der Caenophidia. Die südostasiatisch verbreiteten Gattungen *Python*, *Xenopeltis* und *Cylindrophis* bilden eine Klade und sind die Schwestergruppe der neuweltlichen Boas (Abbildung 7).

Innerhalb der Caenophidia zeichnen sich mit den Elapiden, Colubriden, Crotalinen und Viperinen vier distinkte Haplogruppen ab. Alle Knoten des Elapiden-Zweiges haben maximale Posterior-Probabilities. *Bungarus* (Kraits) bildet mit *Naja* und *Ophiophagus* (Kobras) eine Klade. Wassertrugnattern (Homalopsinae) und Colubridae haben keinen unmittelbar gemeinsamen Vorfahren.

Der bayesianische Inference-Baum unterstützt die Aufteilung der Viperidae in Grubenottern und echte Vipern. Die neuweltliche Grubenotter *Agkistrodon piscivorus* nimmt eine terminale Position in dem Subzweig ein. Ihre Stellung im Baum zeigt, dass die Besiedlung Amerikas von Asien ausgegangen ist. *Deinagkistrodon acutus* steht an der Basis der Crotalidae.

In dem Subzweig der Viperinae repräsentieren die afrikanischen Krötenvipern (*Causus*) eine basale Linie, die den Vipern eurasischen Ursprungs gegenüber steht. Mit Ausnahme des Splits zwischen *Daboia* und *Monti*-, *Macrovipera* (PP 0,99) haben alle Knoten maximale statistische Unterstützung. Die Gattungen *Monti*- und *Macrovipera* gehen auf einen Ursprung zurück und bilden die Schwestergruppe zu *Daboia*. Die kleinen europäischen Arten der Gattung *Vipera* stehen in basaler Position. *Pelias* und *Acridophaga* sind die Schwestergruppe von *Vipera* (s. str.).

### 3.2.3 mt-Genomorganisation der Viperinae

Neun vollständige Nukleotidsequenzen wurden von eurasischen Viperiden neu determiniert. Ihre totalen Längen sind: *Daboia mauritanica* 17.175 bp, *Macrovipera lebetina obtusa* 17.145 bp, *Macrovipera lebetina turanica* 17.164 bp, *Montivipera raddei kurdistanica* 17.197 bp, *Montivipera xanthina* 17.198 bp, *Montivipera wagneri* 17.198 bp, *Vipera ammodytes* 17.180 bp, *Vipera berus bosniensis* 17.357 bp, *Vipera orlovii* 17.522 bp. Alle Mitogenome entsprechen dem typischen Vertebratenaufbau. Die zirkulären Genome codieren zwei rRNAs, 22 tRNAs und 13 protein-codierende Gene. Ihre Genorganisation bestätigt das für Schlangen typische Arrangement mit Duplikation der Kontrollregion (CR2) zwischen ND1 und ND2 zusätzlich zu der Kontrollregion (CR1), die bei allen Vertebraten am 5' Ende des Gens 12s-rRNA vorhanden ist. Die Kontrollregion CR2 ist eine 100% identische Kopie der Kontrollregion CR1.

Längenunterschiede der mt-Genome von bis zu 377 bp gehen auf Sequenzpolymorphismen der Kontrollregionen zurück.

In der Kontrollregion können im Bereich des Promotors oder des Stem-loop ( $O_H$ ) bestimmte Sequenzmotive tandemartig vervielfacht sein. Anzahl und Länge der Motive sind taxonspezifisch. Damit sind sie als phylogenetische Marker geeignet. Die Motive sind Strukturen, die auch zwischen entfernt verwandten Arten den gleichen Aufbau haben. Es sind symmetrische Homopolymere in dessen Zentrum die Basen Thymin und Adenin stehen (Abbildung 8). In 5'- und 3'- Richtung werden sie von zwei C-Stretches flankiert, deren Längen aus sieben oder neun Cytosin-Wiederholungen bestehen. Die Vervielfachung ihrer Anzahl in manchen Kladen ist ein abgeleitetes, seltenes Ereignis und kann daher als Apomorphie betrachtet werden. Im ursprünglichen Zustand sind sie nur jeweils einmal pro Kontrollregion vertreten (Abbildung 9). Der ancestrale Zustand findet sich bei Scolecophidia, Henophidia, Elapidae und Colubridae. Vervielfachungen der Struktur treten erstmals bei den Viperidae auf. In der Unterfamilie der Viperinae trat die Struktur-Mutation bei dem Stammlinienvertreter von *Pelias* auf und wurde im Laufe der Radiation erneut dupliziert. *Vipera* (*Pelias*) *berus bosniensis* verfügt über eine einfache Verdoppelung mit zwei Homopolymeren in jeder Kontrollregion, wohingegen ich bei der Schwesterart *Vipera* (*Pelias*) *orlovi* drei Homopolymere pro Kontrollregion identifizieren konnte.

Die im Laufe der Evolution neu hinzugewonnenen Homopolymere unterscheiden sich von dem plesiomorphen Homopolymer-Typ durch Längenpolymorphismus. Der plesiomorphe Typ, der bei allen Schlangen vertreten ist, besitzt in 5'- und 3'- Richtung vom TA-Dinukleotid neun Cytosin-Basen (total 20 bp). Bei dem abgeleiteten Homopolymer-Typ sind die Cytosin-Stretches statt neun nur sieben Basen lang (total 16 bp). In der

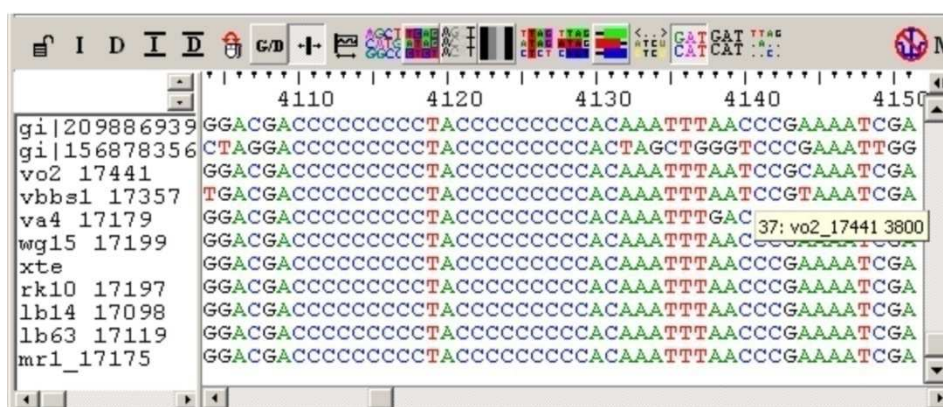


Abbildung 8: Hochkonservierte Sequenzstruktur der Kontrollregion. Der Homopolymer ist eine symmetrische Struktur in dessen Zentrum die Basen TA stehen. Sie werden in 5' und 3' Richtung von zwei C-Stretches flankiert, deren Längen aus sieben oder neun Cytosin-Wiederholungen bestehen. Die gesamte Struktur wurde bis zu drei Mal pro Kontrollregion identifiziert. Ihre Anzahl ist taxonspezifisch.

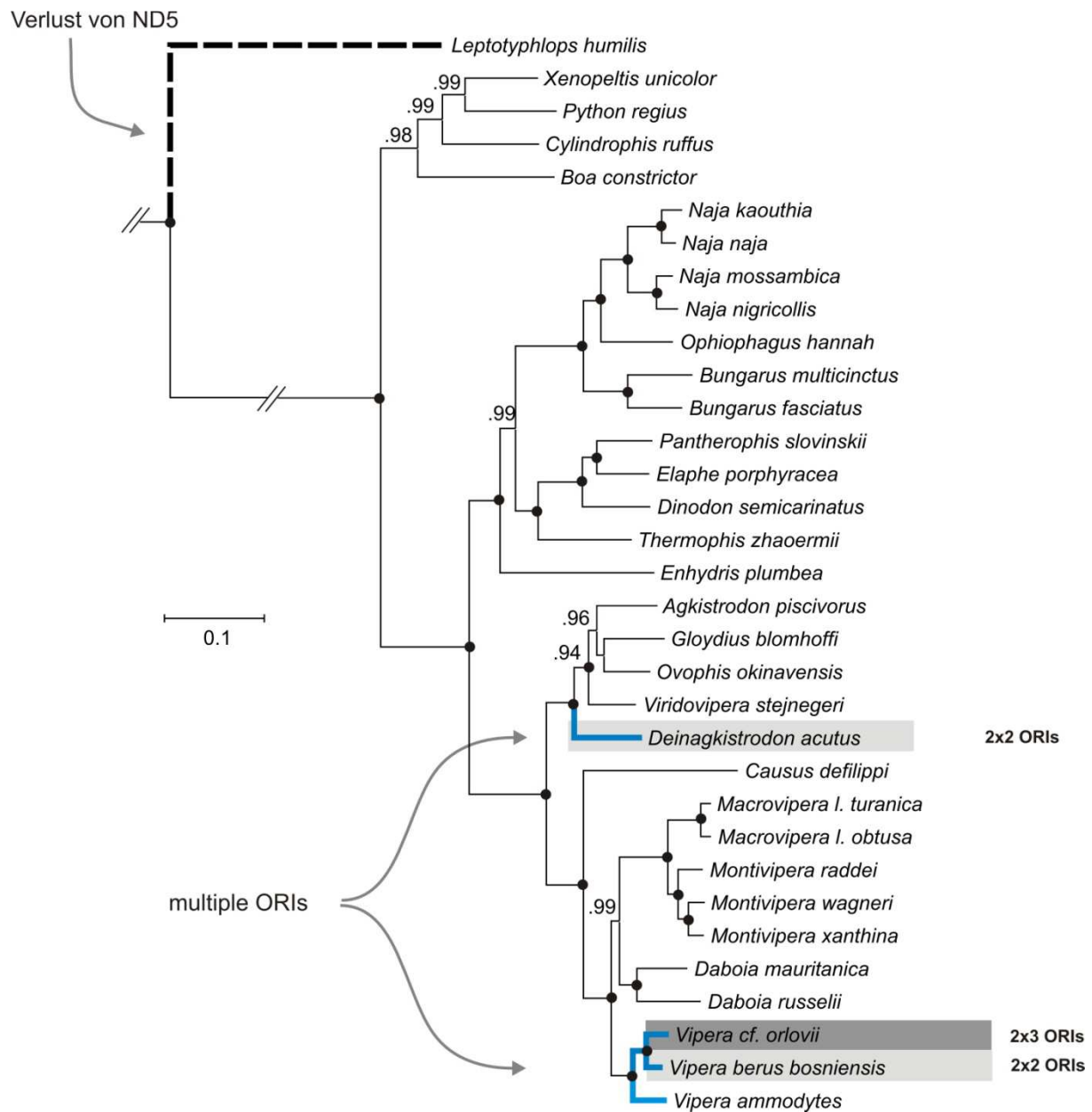


Abbildung 9: "mt-Genome level characters" im Stammbaum der Schlangen (Datensatz 3542). Der evolutive Verlust des protein-codierenden Genes ND5 bei den Scolecophidia ist eine Autapomorphie, die in der Schwestergruppe der Alethinophidia nicht vorkommt. Repetitive Sequenzstrukturen wurden von Crotalinae und Viperinae konvergent oder parallel evolviert und eignen sich innerhalb der Viperinae als phylogenetische Marker. Die Homopolymere sind Strukturen des Stem-Loop ( $O_H$ ). Der Einfachheit halber werden sie hier als ORI (Origin of Replication) bezeichnet. Alethinophidia besitzen ein ORI pro Kontrollregion (insgesamt 1x2 ORIs). Abgeleitete Zustände finden sich in den Gattungen *Deinagkistrodon* und *Vipera* (*Pelias*). In der Abbildung unberücksichtigt blieben t-RNA-Rearrangements. De novo sequenzierte Taxa sind unterstrichen. Alle anderen Sequenzen wurden der Sequenzdatenbank NCBI entnommen.

Schwestergruppe der Viperinae ist es möglicherweise zur konvergenten oder parallelen Entstehung des gleichen Merkmals gekommen. Die Genbanksequenz von *Deinagkistrodon acutus* (gi 164420851) besitzt die gleiche Verdopplung des Homopolymers wie die Sequenzen von *Vipera ammodytes*.

### 3.3 Diskussion

Die vorliegende Studie ist die erste, die phylogenetische Beziehungen der Viperidae auf Grundlage vollständiger Mitogenom-Informationen untersucht.

Der gezeigte BI-Baum (Abbildung 6) bestätigt die von Albert et al. (2009) und Okajima & Kumazawa (2009) veröffentlichten Amnioten-Phylogenien. Mammalia (Synapsida) sind die Schwestergruppe aller übrigen Amnioten (Meyer & Zardoya 2003), die nach dem Nomenklaturcode als Reptilien bezeichnet werden (Modesto & Anderson 2004). Der Datensatz protein-codierender mt-Gene erzeugt in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Kumazawa & Nishida (1999), Janke et al. (2001) sowie Zardoya & Meyer (2001) eine Archosaurier-Clade mit Testudines, Aves und Crocodylia, die durch maximale Posterior-Probabilities abgesichert ist. Innerhalb der Lepidosaurier bildet die Brückenechse als monotypische Gattung der Rhynchocephalia die Schwesterlinie zu den Squamaten (Rest et al. 2003).

Verwandtschaftshypothesen innerhalb der Squamata sind inkonsistent. Topologische Positionen einzelner Gruppen sind unter anderem von den verwendeten Markergenen und dem „Taxon-Sampling“ abhängig. Okajima & Kumazawa (2009) analysierten unter Ausschluss der Acrodonta und Serpentes die ersten beiden Codon-Positionen von 12 protein-codierenden mt-Genen des L-Stranges. Ihre Topologie ist in Teilen zu der hier vorgestellten kongruent. Beiden Bäumen sind die basale Position der Gekkota und die Klade bestehend aus Iguanidae, Lacertidae und Amphisbaenidae gemein. Unterschiedlich ist die Position der Anguimorpha, die in dem hier gezeigten Baum die Schwestergruppe zu Acrodonta und Serpentes darstellt, während sie bei Okajima & Kumazawa (2009) mit den Iguaniden clustert.

Albert et al. (2009) verwendeten einen äquivalenten Datensatz von 13 protein-codierenden mt-Genen und untersuchten den Effekt des „Taxon-Sampling“ auf die Phylogenie der Squamaten. In ihrer Phylogenie steht die Clade Serpentes-Acrodonta an der Basis der Squamaten und damit im Konflikt zu publizierten Phylogenien von Douglas et al. (2006), Böhme et al. (2007), Okajima & Kumazawa (2009) sowie der hier gezeigten. Gekkota haben eine intermediäre Position zwischen Acrodonta-Serpentes und den restlichen Squamaten-Linien. In weiteren Analysen zeigen die Autoren, dass die Monophylie und Paraphylie bestimmter Squamaten-Gruppen durch das Taxon-Sampling beeinflussbar ist. Je nach



verwendeten Taxa sind die Amphisbaenidae oder Scincomorpha para- oder monophyletisch.

Townsend et al. (2004) untersuchten die Verwandtschaftsbeziehungen der Squamaten auf Basis diploider Marker. Die Quintessenz ihrer Arbeit zeigt den unabhängigen Ursprung der beinlosen Squamaten Serpentes, Amphisbaenidae und Dibamidae sowie die Paraphylie der Scleroglossa. Es gelang den Autoren jedoch nicht, die Position der Schlangen zweifelsfrei zu bestimmen, wenngleich ihre Daten für eine verschachtelte Position innerhalb der Squamaten sprechen.

Von einigen Autoren wurde die Abstammung der Schlangen und Anguimorpha von einem gemeinsamen Vorfahren postuliert (z.B. McDowell & Bogert 1954, Lee 1998, Reynoso 1998, Lee & Caldwell 1998). Kerngenanalysen scheinen die Hypothese eines gemeinsamen Vorfahren zwischen Schlangen und Anguimorpha zu bestätigen (Townsend et al. 2004, Hugall et al. 2007). Dennoch sind die Untersuchungen zur Verwandtschaft der Schlangen zwischen unterschiedlichen Autoren nicht konsistent. Während die genannten Autoren ein Schwestergruppenverhältnis der Schlangen zu Anguimorpha postulieren, fanden Böhme et al. (2007) (mt-Gene) sowie Albert et al. (2009) (nc-Gene) einen gemeinsamen Ursprung der Schlangen mit Amphisbaeniden. Das phylogenetische Signal protein-codierender mt-Gene unterstützt das Schwesterverhältnis der Schlangen zu acrodonten Squamaten (z.B. Albert et al. 2009, Castoe et al. 2009), das mit den meisten morphologischen und molekularen Untersuchungen inkongruent ist.

Bereits Townsend et al. (2004) vermuteten hinter der phylogenetischen Beziehung die Anziehung langer Zweige („Long-branch-attraction“). Castoe et al. (2009) gelang der Nachweis der „Long-branch-attraction“ (LBA) als Quelle des abberanten phylogenetischen Signals. Die Autoren konnten zeigen, dass nicht-neutrale konvergente molekulare Evolution zwischen Schlangen und Agamen die Rekonstruktion der Phylogenese in die Irre leitet. Eine mögliche Ursache für die konvergente Evolution ist die Adaptation. In vorherigen Untersuchungen (Castoe et al. 2008) gelang den Autoren der Nachweis, dass mitochondriale Schlangenproteine eine der extremsten evolutionären Adaptationen unter Vertebraten erfahren haben. Als Grund für die radikalen physiologischen Anpassungen nennen die Autoren die Effizienzsteigerung des aeroben Metabolismus. Die molekulare Konvergenz zwischen Agamen und Schlangen wurde durch ähnlichen Selektionsdruck auf metabolische Funktionen angetrieben.

Ursachen der LBA sind falsche Einschätzungen der Ratenheterogenität zwischen Sequenzpositionen (Lartillot et al. 2007). Die LBA lässt sich nach Brinkmann et al. (2005) durch größere neutrale Konvergenz in schnell evolvierenden Sequenzpositionen diagnostizieren. Entgegen der Annahme von Brinkmann et al. (2005) zeigten Castoe et al.

(2008) in ihren Untersuchungen, dass insbesondere die zweite langsam evolvierende Codon-Position den Cluster Acrodonta-Serpentes auslöst.

Obwohl das „CAT“-Aminosäuremodell speziell für die Bewältigung des LBA-Problems entwickelt wurde (Lartillot et al. 2007), zeigt die Phylogenie in Abbildung 6 die gleiche Topologie wie in den nukleotid-basierten Phylogenien von z.B. Townsend et al. (2004), Albert et al. (2009) und Castoe et al. (2009).

Die Phylogenie der Schlangen zeigt die traditionelle Division der Serpentes in die drei Großgruppen Scolecophidia, Haenophidia und Caenophidia (z.B. Pough et al. 2004). Im Vergleich zu anderen Vertebratengruppen sind vollständige Mitogenome der Squamaten und insbesondere die der Schlangen in den molekularen Datenbanken unterrepräsentiert (Kumazawa 2007). Die 24 verfügbaren publizierten Mitogenome sowie die neun de novo sequenzierten Genome repräsentieren daher nicht alle beschriebenen Schlangenfamilien.

Die topologische Struktur des Baumes in

Abbildung 7 ist deckungsleich mit den Untersuchungen von Yan et al. (2008) und identifiziert Scolecophidia als die basalste rezente Schlangen-Gruppe. Nach morphologischen Untersuchungen schlagen Bellairs & Underwood (1951) einen paraphyletischen Ursprung der Scolecophidia vor, der von molekularen Stammbäumen jedoch nicht konsistent bestätigt wird (Vidal & Hedges 2002b, Yan et al. 2008).

Posterior-Probabilities stützen die Trennung der Alethinophidia in die beiden Schwestergruppen Henophidia und Caenophidia. Das Schwestergruppenverhältnis bestätigt die Mitochondrien-Stammbäume z.B. von Dong & Kumazawa (2005), Jiang et al. (2007) und Yan et al. (2008), während Kerngenanalysen hingegen eine Paraphylie der Henophidia zeigen (z.B. Vidal & David 2004), die in Abhängigkeit vom Rekonstruktionsverfahren auch in mt-Genomstammbäumen auftrat (siehe Douglas & Gower 2010).

Innerhalb der modernen Schlangen (Caenophidia) erweisen sich in Übereinstimmung mit morphologischen (z.B. Greene 1997) und genetischen (z.B. Vidal & Hedges 2002a) Untersuchungen die Acrochordidae als die Schwestergruppe der Colubroidea. Kelly et al. (2003) schlagen vor, dass Acrochordidae und Xenodermatidae die Wurzel der übrigen Colubroidea bilden. Vidal et al. (2007) klassifizieren sieben Superfamilien innerhalb der Caenophidia. Zu ihnen zählen sie auch die basalen Acrochordoidea und Xenodermatoidea sowie Viperioidea, Pareatoidea, Homalopsoidea, Elapoidea und Colubroidea.

Der mt-Genom-Datensatz umfasst nur fünf der bekannten Schlangenfamilien und lässt daher keine generellen systematischen Schlüsse zu.

Homalopsinae wurden als valide Gruppe innerhalb der Colubridae anerkannt (Green 1997, Zug et al. 2001, Yan et al. 2008), dennoch erhielten sie den Rang einer Unterfamilie, obwohl sie historisch bereits den Status einer Familie besaßen (Günther 1864). Molekulare

Untersuchungen platzierten sie als Schwestergruppe zu den meisten anderen Familien der Colubroidea (Lawson et al. 2005, Vidal et al. 2007, Kelly et al. 2003). Mittlerweile werden die Homalopsidae als eigene Familie der Colubroidea betrachtet (Lawson et al. 2005, Vidal et al. 2007, Wiens et al. 2006, Yan et al. 2008).

Unter den Giftnattern bilden die Arten, die zur „Hutbildung“ befähigt sind (*Naja* und *Ophiophagus*) eine monophyletische Klade, die den Kraits (*Bungarus*) gegenüber stehen. Bayesianische Nukleotid-Phylogenien von Kelly et al. (2003) und Wüster et al. (2008) stellen die Kraits jedoch näher zu *Naja* als zu *Ophiophagus*.

Innerhalb der Colubroidea bilden die Viperidae eine monophyletische Klade, die nach Lawson et al. (2005) einen gemeinsamen Ursprung mit den asiatischen Schnekennattern (Pareatidae) haben, während sie nach Untersuchungen von Vidal et al. (2007) an der Basis der Colubroidea und Elapoidea stehen.

Zahlreiche anatomische Merkmale, wie das frei drehbare Maxillare, unterstützen den monophyletischen Ursprung der Viperidae (Cadle 1992, Kochva 1978, Underwood & Kochva 1993, Zaher 1999) und befinden sich in Konkordanz mit immunologischen und sequenzbasierten Studien (Cadle 1988, Kelly et al. 2003, Lenk et al. 2001, Parkinson 1999, Wüster et al. 2008).

Innerhalb der Viperidae bilden die Viperinae und Crotalinae zwei Kladen, deren monophyletische Ursprünge durch maximale Posterior-Probabilities gestützt sind. Die phylogenetische Beziehungen der fünf Grubenotter-mt-Genome korrelieren mit den publizierten Stammbäumen von Wüster et al. (2008). Allerdings zeigen die äquivalenten Knoten mit einer Ausnahme keine robusten Unterstützungswerte in der genannten Publikation. Der hier vorliegende Stammbaum validiert somit durch seine hohen Posterior-Probabilities die Topologie von Wüster et al. (2008).

Über die Stammesgeschichte der echten Vipern (Viperinae) wird bis in die jüngste Zeit kontrovers diskutiert. Molekulargenetische Untersuchungen zur Phylogenie der Viperinae stehen partiell miteinander im Konflikt (z.B. Herrmann & Joger 1995, 1997, Herrmann et al. 1999, Lenk et al. 2001, Wüster et al. 2008). Mehrere unabhängige Arbeiten (z.B. Herrmann et al. 1999, Lenk et al. 2001 und Wüster et al. 2008) bestätigen zwar die Monophylie der eurasischen Viperinae, dennoch können sie die Position von *Vipera* innerhalb der eurasischen Viperiden nicht eindeutig klären. So präsentieren Lenk et al. (2001) in Abhängigkeit vom Baumsuchverfahren *Vipera* entweder als Schwestergruppe von *Daboia* oder von *Monti*- und *Macrovipera*. In einer bayesianischen Analyse (MrBayes) von Wüster et al. (2008) auf Basis von zwei ribosomalen und zwei protein-codierenden mt-Genen gehen *Vipera* und *Daboia* auf einen gemeinsamen Ursprung zurück. Die gemeinsame Abstammung von einem Stammlinienvertreter ist morphologisch jedoch sehr

unwahrscheinlich. Merkmale wie die Nasenprotuberanz sowie die Tendenz zur Ausbildung großer Kopfschuppen sind synapomorphe Merkmale der Gattung *Vipera* (z.B. Brodmann 1987), die sich nicht bei *Daboia* finden. Dagegen sprechen der völlig aufgelöste Pileus sowie eine runde Schnauzenspitze mit großem Nasale für den gemeinsamen Ursprung von *Daboia*, *Macro-* und *Montivipera*.

Unterschiedliche Substitutionsraten entlang einer Nukleotidkette haben einen Einfluss auf die Akkuratheit modellbasierter Baumrekonstruktionsverfahren. Substitutionsraten variieren zwischen Codon-Positionen („Among-site-rate-variation“), zwischen verschiedenen evolutionären Linien („Among-lineage-rate-variation“), entlang der Zeitachse („Heterotachy“) und zwischen Regionen unterschiedlicher Basen-Komposition („Compositional-bias“) (z.B. Simon et al. 2006). Fallbeispiele für nicht homogene Substitutionsraten sind die ribosomalen RNAs mit hochkonservierten Sekundärstrukturen, bei denen gepaarte („Stems“) mit ungepaarten („Loops“) Regionen wechseln. Räumliche, mehrdimensionale Strukturen (Sekundär- und Tertiärstrukturen) der rRNA-Moleküle werden durch Baseninteraktionen erzeugt (z.B. Hickson et al. 1996). Regionen, die für die räumliche Stabilität von Bedeutung sind, haben daher evolutiv hochkonservierte Nukleotidabfolgen mit geringeren Substitutionsraten.

Das Problem der Baseninteraktionen wird von einer wachsenden Anzahl neuer Evolutionsmodelle berücksichtigt, die explizit Kovarianz innerhalb der rRNA-Moleküle beschreiben (Smith et al. 2004). Die neuen Modelle sind allerdings nur selten in die phylogenetischen Programme integriert (Kjer 2004).

Die meisten Verfahren zur nukleotid-basierten Stammbaumrekonstruktion nehmen, mit Ausnahme von PHASE (Gowri-Shankar & Rattray 2007), eine homogene Nukleotid-Evolution an. Möglicherweise wird das phylogenetische Signal der RNA-Sequenzen in den Analysen von Wüster et al. (2008) mit dem Programm MrBayes nicht adäquat interpretiert.

Schließlich enthalten rRNA-Sequenzen massive Längenpolymorphismen, die aufgrund ihrer Indels nur schwer zu alignieren sind. Ihr phylogenetisches Signal ist für die Stammbaumrekonstruktion nur bedingt verwertbar (Simon et al. 2006).

Gesättigte Sequenzen und unterschiedliche Substitutionsraten können die phylogenetische Rekonstruktion beeinflussen und zu inkorrekten Hypothesen führen (z.B. Sheffield et al. 2009). In das von Lartillot et al. (2007) entwickelte Programm Phylobayes ist ein nichthomogenes Modell zur Aminosäuresequenz-Evolution integriert, das nicht nur die „Long-branch-attraction“, sondern auch „Site-specific-features“ der Sequenzevolution berücksichtigt. Die Autoren zeigen, dass das verwendete „CAT-Dirichlet-process-mixture-model“ anderen Standard-Aminosäure-Matrizes überlegen ist (Lartillot & Philippe 2004, Blanquart & Lartillot 2006). Zudem ist das Übersetzen der Nukleotidsequenzen in

Aminosäure-Sequenzen eine effektive Methode, Homoplasien durch unterschiedliche Basenkompositionen zu umgehen (Loomis & Smith 1990, Nardi et al. 2001, Cameron et al. 2004). Der vorliegende Stammbaum auf Basis von 11 protein-codierenden Aminosäuresequenzen löst die Beziehungen zwischen *Vipera* und *Daboia*, *Monti*- und *Macrovipera* erstmals zuverlässig auf. *Vipera* ist demnach die Schwestergruppe der orientalischen Vipern. *Daboia*, *Macro*- und *Montivipera* gehen auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück. Unter den Bergottern (*Montivipera*) stellt *M. raddei* die Schwesterart zu *M. xanthina* und *M. wagneri* dar (versus Lenk et al. 2001). Die phylogenetische Beziehung ist durch morphologische Merkmale gestützt. Ein geschlossener Zirkumkularring unterscheidet *M. raddei* von *M. xanthina* und *M. wagneri* (Nilson & Andrén 1986a).

Die Sättigungsanalyse zeigt die Mehrfachsubstitutionen in allen Codon-Positionen an und bestätigt die Notwendigkeit, insbesondere für tiefe Phylogenien effektive Korrekturverfahren zur Reduktion von Homoplasien zu ergreifen, wie den Ausschluss der dritten Codonposition (z.B. Xia 2009) von den Analysen oder die Übersetzung der Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen (Loomis & Smith 1990, Nardi et al. 2001, Cameron et al. 2004).

Schlangen haben unter Vertebraten besonders schnelle mitochondriale Evolutionsraten (Dong & Kumazawa 2005, Kumazawa et al. 1998), die von der Genfunktion abhängig zu sein scheinen. Jiang et al. (2007) konnten nachweisen, dass ribosomale Gene am konservativsten sind, während Gene, die in die oxidative Phosphorylierung eingebunden sind, besonders schnell evolvieren.

Die genetische Architektur der mt-Genome bietet eine spezielle Qualität der phylogenetischen Information. Sogenannte „Genome-level-characters“ (Nikaido et al. 1999) wie RNA-Sekundärstrukturen (Macey et al. 1997, 2004), physische Strukturen (Bridge et al. 1992) und relative Anordnungen der Gene („Gene-rearrangements“) können aussagekräftige Indikatoren für eine gemeinsame Abstammung bieten (Boore et al. 2005). Kumazawa et al. (1996, 1998) und Dong & Kumazawa (2005) berichten über neue mt-DNA-Anordnungen in acht Schlangenarten der Familien Viperidae, Colubridae, Acrochordidae, Pythonidae, Boidae und Xenopeltidae.

Die Längen der sequenzierten Vipern-Genome sind mit anderen Schlangengenomen von Kumazawa (2004) und Jiang et al. (2007) vergleichbar.

In dem annotierten mt-Genom von *Montivipera xanthina* wurden 22 transfer-RNA-Gene (tRNA), zwei ribosomale-RNA-Gene (rRNA) und 13 protein-codierende Gene identifiziert. Ihre Anordnung ist äquivalent zu anderen Schlangenarten. „Large-scale“-Abweichungen waren nicht erkennbar.

Wie bei allen bekannten Alethinophidia-mt-Genomen sind auch bei den neun de novo sequenzierten mt-Genomen die Kontrollregionen verdoppelt. Zusätzlich zu der originalen Kontrollregion (CR1), die bei allen Vertebraten am 5' Ende des Gens 12s rRNA liegt (Dong & Kumazawa 2005), befindet sich eine zweite Kontrollregion (CR2) zwischen den Genen ND1 und ND2. Beide Kontrollregionen haben innerhalb desselben Genoms identische Sequenzen, was auf eine gemeinsame Evolution und Aktivität hindeutet. Der Besitz von zwei funktionsfähigen Kontrollregionen seit der Evolution der Schlangen ist ein Selektionsvorteil und wirkt sich möglicherweise vorteilhaft auf die Geschwindigkeit der Replikation aus (Jiang et al. 2007).

Replikation und Transkription sind in mt-Genomen funktional nicht völlig von einander getrennt (Fernandez-Silva et al. 2003). Die strukturelle Genomarchitektur ist daher von besonderer Bedeutung.

In allen alignierten Schlangen-Genomen wurde eine charakteristische hochkonservierte Sequenzstruktur der Kontrollregion identifiziert, die bei einigen Arten verdoppelt und transloziert wurde. Der Homopolymer ist nach He et al. (2010) eine nicht-codierende Region, die homolog zum Start der Kontrollregionen (Cr1, CR2) ist und bei *Thermophis zhaoermii* oberhalb der Pseudo-t-RNA<sup>Pro</sup> liegt.

Verdopplungen und Translokationen sind taxonspezifisch innerhalb der eurasischen Viperiden. Sie besitzen phylogenetische Information und sind deshalb als „Small-scale-rearrangements“ zur Identifizierung monophyletischer Linien geeignet.

Nach der sparsamsten Erklärung hatte die Stammart eurasischer Viperiden, wie alle anderen Schlangen auch, nur ein ORI pro Kontrollregion. Verdopplungen sind als apomorphes Merkmal nur in dem *Vipera (Pelias)*-Zweig (s.l.) aufgetreten. Orientalische Vipern haben nach wie vor den ancestralen Zustand der Schlangen beibehalten. Innerhalb der Gattung *Vipera* besitzt *V. ammodytes* mit einem ORI einen ursprünglichen Merkmalszustand und *V. b. bosniensis* und *V. orlovii* (*V. kaznakovii*) einen synapomorphen Zustand mit 2 bzw. 3 ORIs. Die Vervielfachung der ORIs korreliert mit der Topologie in Abbildung 9 und bestätigt die basale Position von *V. ammodytes* innerhalb paläarktischer Viperinae<sup>3</sup>.

Obwohl Genduplikationen und Rearrangements nach Boore et al. (2005) seltene Ereignisse sind, von denen man annimmt, sie entstehen nicht konvergent oder parallel, wurden in der Sequenz von *Deinagkistrodon piscivorus* identische Duplikationen gefunden.

---

<sup>3</sup> Paläarktische Viperinae umfassen alle Taxa, die zoogeographisch der paläarktischen Fauna zugerechnet werden (*Vipera* s. l., *Macrovipera*, *Montivipera*, *Daboia*, *Eristicophis*, *Pseudocerastes*). Die bikontinental verbreiteten Gattungen *Echis* und *Cerastes* sind zoogeographisch ambivalent.

## 4 Divergenzzeiten der Viperinae auf der Basis vollständiger mt-Genome

### 4.1 Einleitung

Molekulare Uhren sind für das Erfassen der zeitlichen Dimension des „Tree-of-life“ unabdingbar (Hedges & Kumar 2009). Die Datierung von Speziationseignissen ist eins der größten Anliegen evolutionärer Studien. Die Kenntnis über den zeitlichen Ursprung von Organismen gewährleistet wertvolle Einblicke in geologische und klimatologische Prozesse, die zur Diversität heutiger Arten geführt haben.

Nach der Postulierung einer molekularen Uhr durch Zuckerkandl & Pauling (1962) und der Annahme konstanter Evolutionsraten entlang der Zeit herrscht breite Übereinstimmung darüber, dass die Evolution nicht durch ein so simplifiziertes, biologisch unrealistisches Modell erklärt werden kann. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass sich Evolutionsraten innerhalb des Genoms (Matassi et al. 1999), zwischen verschiedenen Linien (Smith & Donoghue 2008) im Laufe der Zeit (Fitch & Markowitz 1970, Lopez et al. 2002) durch Generationszeiten, Populationsgrößen, Linieneffekte und durch Veränderungen der natürlichen Selektion (Ayala 1999) unterscheiden.

Bayesianische Markov-Chain-Monte-Carlo- (MCMC) und Maximum-Likelihood- (ML) Techniken bieten die Möglichkeit, Ratenheterogenität zwischen Zweigen zu berücksichtigen und erlauben somit auch die Berechnung von Divergenzzeiten, wenn die molekulare Uhr verletzt wird (Thorne et al. 1998, Sanderson 2002, Yang & Yoder 2003).

Für relaxierte Uhren wurden zahlreiche Methoden vorgeschlagen, wie nichtparametrische Ansätze (Sanderson 1997, 2002), lokale Uhren (Yoder & Yang 2000) und bayesianische parametrische Modelle (Thorne et al. 1998, Huelsenbeck et al. 2000, Kishino et al. 2001, Aris-Brosou & Yang 2002, 2003, Drummond et al. 2006).

Die bayesianische Inferenz hat gegenüber ML den Vorteil, dass die Priors der Divergenzzeiten die Unsicherheiten der Knotenalter berücksichtigen (Yang 2006). Bedingt durch die größere Verfügbarkeit unterschiedlicher Algorithmen und alternativer Modelle (Thorne et al. 1998, Thorne & Kishino 2002, Drummond & Rambaut 2007, Yang 2007, Lepage et al. 2007) sind die bayesianischen MCMC-Verfahren in ihrer Popularität gestiegen.

In der Anwendung befinden sich viele verschiedene Wahrscheinlichkeitsmodelle relaxierter Uhren, die den Substitutionsprozess als kontinuierlichen Vorgang (Kishino et al. 2001) und als eine teilweise konstante Funktion der Zeit (Huelsenbeck et al. 2000) beschreiben. Andere modellieren den Ratenprozess nicht explizit und nehmen einen durchschnittlichen Wert für jeden Zweig an (Aris-Brosou & Yang 2003, Drummond et al. 2006).

Substitutionsmodelle unterscheiden sich außerdem in ihrer Dynamik. Raten können autokorreliert sein, (Kishino et al. 2001, Aris-Brosou & Yang 2003) oder keine Autokorrelation annehmen (Drummond et al. 2006). Das bereits 1970 von Fitch & Markowitz beschriebene Phänomen der Heterotachie wird erneut von der Wissenschaft aufgegriffen und ist Thema aktueller Veröffentlichungen zu molekularen Uhren. Heterotachie beschreibt die Tatsache, dass Substitutionsraten nicht nur zwischen Positionen sondern auch in der Zeit variieren können (z.B. Zhou et al. 2009). Auf Basis ihrer Erkenntnisse schlagen Fitch & Markowitz (1970) das „Covarion-Modell“ zur Sequenzevolution vor. Lopez et al. (2002) konnten nachweisen, dass 95% der Cytb-Positionen bei Vertebraten von dem Heterotachie-Phänomen betroffen sind und das phylogenetische Signal potentiell stören (z.B. Lockhart et al. 1996).

Schließlich wurden verschiedene Divergenzzeiten-Priors („Tree-priors“) eingeführt, wie der „Uniforme-“ (Kishino et al. 2001, Drummond et al. 2006), „Dirichlet-“ (Thorne & Kishino 2002) und der „Birth-death-Prior“ (Aris-Brosou & Yang 2003, Yang & Rannala 2006).

Welches der vielen verfügbaren Modelle jedoch die Evolution am realistischsten abbildet, bleibt eine offene Frage (Lepage et al. 2007). So kann beispielsweise keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob Autokorrelation ein unbedingter Bestandteil relaxierter Uhren sein soll (Drummond et al. 2006). In einigen Fällen wurden sogar Kontroversen darüber geführt, ob relaxierte Uhren an sich zu einem „Bias“ führen (Aris-Brosou & Yang 2003), oder ob es vielmehr die „Divergenzzeiten-Priors“ sind, die zur Verzerrung der Ergebnisse führen (Blair & Hedges 2005, Welch et al. 2005).

Im Allgemeinen ist es das verwendete Modell, das den entscheidenden Einfluss auf die resultierenden Divergenzzeiten ausübt (Perez-Losada et al. 2004, Smith et al. 2006). Ein Umstand, der nach Lepage et al. (2007) nicht hilft, die Kontroversen zwischen Fossilaltern und molekularen Datierungen auszuräumen (Bromham et al. 1999, Smith & Peterson 2002). Die Entscheidung zwischen verschiedenen alternativen Modellen stützt sich nicht auf statistische Tests, sondern ist auch durch subjektive Kriterien wie die Praktikabilität der Software-Pakete beeinflusst. Lepage et al. (2007) bemerken daher: *„Deciding between alternative models of clock relaxation is obviously an urgent question to be answered.”* (S. 2669).

Um Phylogenien eine zeitliche Dimension zu verleihen, sind Kalibrierungspunkte essentiell, weil das absolute Alter nicht anhand von molekularen Daten allein berechnet werden kann. Beobachtete genetische Distanzen resultieren aus zwei Komponenten, der Substitutionsrate und der verstrichenen Zeit. Beide sind nicht ohne zusätzliche unabhängige Information



voneinander trennbar (Ho & Phillips 2009). Hierzu können Kenntnisse über die Knotenalter genauso wie ermittelte Substitutionsraten als unabhängige Informationsquellen genutzt werden. In den meisten Fällen werden jedoch Zeitangaben zu internen Knoten für die Kalibrierung verwendet, wie Fossilnachweise oder biogeographische Ereignisse. Neue Methoden, wie die relaxierten Uhren, ermöglichen den flexiblen Umgang mit mehreren Kalibrierungspunkten (Graur & Martin 2004, Hedges & Kumar 2004, Donoghue & Benton 2007) und ermöglichen außerdem die adäquate Nutzung der zeitlichen Information durch zahlreiche neue Kalibrierungstechniken. Knoten lassen sich traditionell über Punktkalibrierungen oder Intervallzeiten mit harten Maximum-Minimum-Grenzen sowie weichen Grenzen eichen. Populär ist in jüngster Zeit die Anpassung der Kalibrierungszeiten an Verteilungsfunktionen geworden. So lassen sich Zeitintervalle über Normal-, Lognormal- oder durch Exponentialverteilungen modellieren und dadurch Wahrscheinlichkeiten über die Trennung zweier Linien implizieren.

Mit dem Ziel, den Nutzen molekularer Uhren nachzuweisen, vergleichen verschiedene Autoren unterschiedliche Datierungs-Methoden, verschiedene Softwarepakete, alternative Kalibrierungspunkte und Taxa sowie Gene miteinander (Hedges et al. 2004, Perez-Losada et al. 2004, Ho et al. 2005, Linder et al. 2005, Hug & Roger 2007, Lepage et al. 2007, Rutschmann et al. 2007, Brown et al. 2008, Poux et al. 2008).

Durch derartige Vergleiche können Aussagen zur Robustheit des getesteten Datensatzes getroffen werden. Sie evaluieren jedoch nicht die Akkuratheit evolutionärer Annahmen.

Divergenzzeiten-Analysen zum Ursprung eurasischer Viperiden auf Basis von Nukleotidsequenzen wurden bisher nur von wenigen Autoren vorgenommen (siehe Ursenbacher et al. 2008, Wüster et al. 2008, Barbanera et al. 2009). Wüster et al. (2008) datieren den Ursprung der Viperidae (Viperoidea) für einen sehr umfangreichen Datensatz auf 47,4 Mio. Jahre. Der letzte gemeinsame Vorfahre eurasischer Viperinae (Viperidae) hat nach ihren Schätzungen vor 39,7 Mio. Jahren gelebt. Fossile Überlieferungen eurasischer Viperinae (Viperidae) bieten jedoch weder exakte Kalibrierungspunkte, noch sind sie zur Validierung berechneter Divergenzzeiten geeignet. Wüster et al. (2008) nutzen zur zeitlichen Eichung des Viperidae-Subzweiges (Viperoidea) drei interne Kalibrierungspunkte, von denen einer innerhalb eurasischer Vipern gesetzt wurde. Die Autoren nehmen an, die initiale Radiation eurasischer Viperinae habe vor 20 Mio. Jahren begonnen. Tatsächlich ist die Annahme aber nicht ausreichend gut durch Fossilfunde gestützt. Der Fossilrekord (Szyndlar & Rage 1999) zeigt, dass eine Radiation eurasischer Viperinae in die Linien

*Vipera*, *Macro*-, *Montivipera* und *Daboia* erst sicher aus der Biozone MN 4 zu belegen ist (siehe auch Kapitel 8).

Ich sehe daher die Notwendigkeit, das Divergenzalter eurasischer Vipern in einem unabhängigen Versuchsaufbau, ohne die Gefahr von Zirkelschlüssen durch interne Kalibrierungspunkte erneut zu testen, um Antworten auf die folgenden Fragen zu finden:

1) Lässt sich das von Wüster et al. (2008) berechnete Alter eurasischer Vipern auch durch eine unabhängige Berechnung ohne Kalibrierungspunkte innerhalb der Viperinae bestätigen?

2) Welchen Einfluss haben verschiedene relaxierte Modell-Annahmen auf die Knotenalter?

Für die Beantwortung der Fragen wurde ein bayesianischer Algorithmus zur molekularen Datierung mit relaxierten Uhren verwendet. Der Datensatz umfasst 52 relevante Amnioten-Taxa, darunter 16 Viperiden, von denen neun de novo sequenziert wurden. Analysiert wurden 11 verkettete proteincodierende Aminosäuresequenzen des mitochondrialen L-Stranges mit dem Programm Phylobayes3.2d (Lartillot et al. 2009). Zur Eichung der molekularen Phylogenie wurden 10 verifizierte paläontologische Befunde von Benton & Donoghue (2007), Müller & Reisz (2005), Rage et al. (1992), Sues & Olsen (1990) und Szyndlar & Rage (1990) herangezogen.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Auswirkung verschiedener „Relaxed-clock-models“ und „Tree-priors“ auf die Knotendivergenzzeiten

Zunächst untersuchte ich die Reproduzierbarkeit der Knotenalter sowie die Auswirkungen unterschiedlicher relaxierter Uhr-Hypothesen und Divergenzzeit-Priors auf den Datensatz 3542.

Abbildung 10 zeigt die Reproduzierbarkeit der Knoten-Divergenzzeiten zwischen zwei unabhängigen MCMC-Analysen unter dem CAT-Poisson-Prozess. Hierfür wurden die Knoten-Divergenzzeiten aus zwei unabhängigen Berechnungen gegeneinander aufgetragen. Die Werte divergieren nur geringfügig voneinander und zeigen eine hoch signifikante Korrelation ( $r_s = 0,999$ ,  $p < 0,0001$ ).

In einem nächsten Schritt untersuchte ich die Sensitivität unterschiedlicher „Relaxed-clock-models“ auf die Knotendivergenzzeiten. In vier unabhängigen bayesianischen MCMC-Analysen wurden die Knotenalter mit den Modellen „Strict-molecular“, „Lognormal“ (Thorne et al. 1998), „White-noise“ und „Uncorrelated-gamma“ (Drummond et al. 2006) berechnet und graphisch dargestellt. Die Abbildung 11 und Abbildung 12 veranschaulichen teilweise

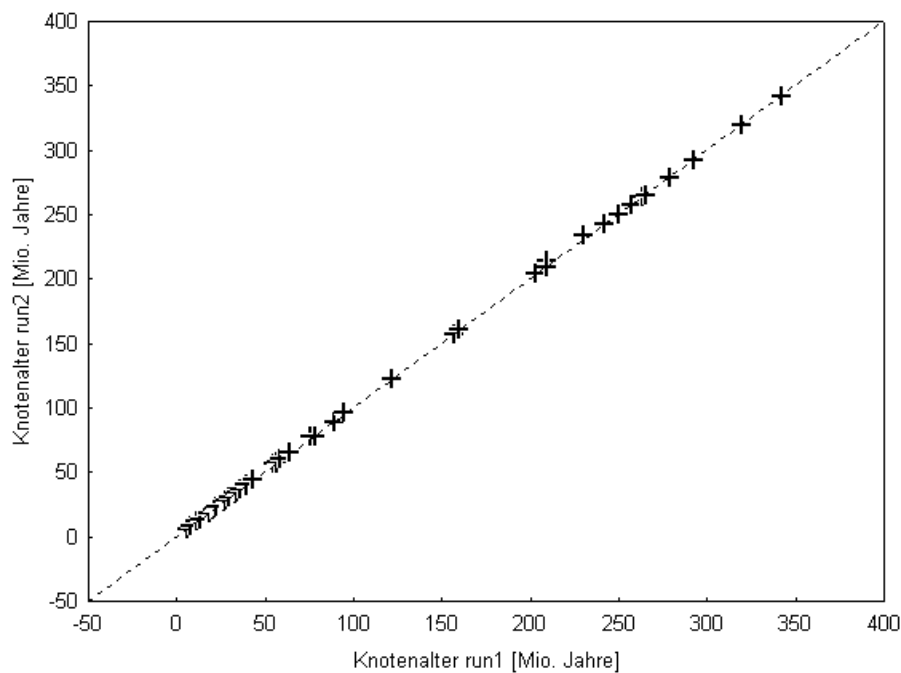


Abbildung 10: Vergleich von Knoten-Divergenzzeiten (Datensatz 3542) zwischen zwei unabhängigen Analysen [run1/run2], durchgeführt mit dem Programm PhyloBayes3.2d (Lartillot et al. 2009). Beide MCMC-Analysen wurden unter dem CAT-Poisson-Prozess durchgeführt. Die Divergenzzeiten der Knoten unterscheiden sich zwischen den unabhängigen Berechnungen nur unbedeutend.

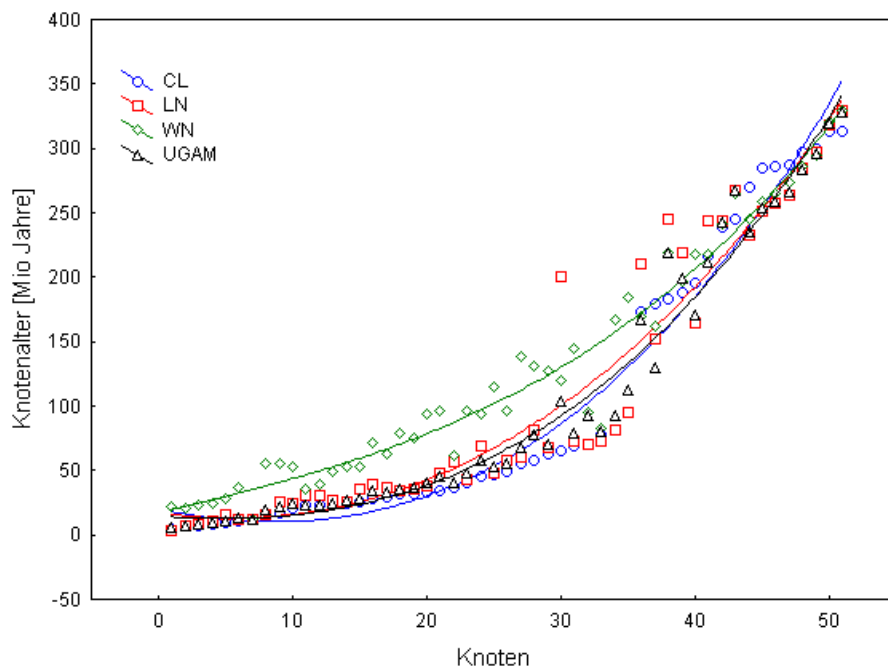


Abbildung 11: Auswirkung vier unterschiedlicher "Relaxed-clock-models" auf die Knotendivergenzzeiten (Datensatz 3542), berechnet mit dem Programm Phylobayes3.2d (Lartillot et al. 2009). Nicht autokorrelierte Modelle: CL = „Strict-molecular-clock“, UGAM = „Uncorrelated-gamma-model“ (Drummond et al. 2006), WN = „White-noise“ (Lepage et al. 2007). Autokorrelierte Modelle: LN = „Lognormal“ (Kishino et al. 2001, Thorne et al. 1998).

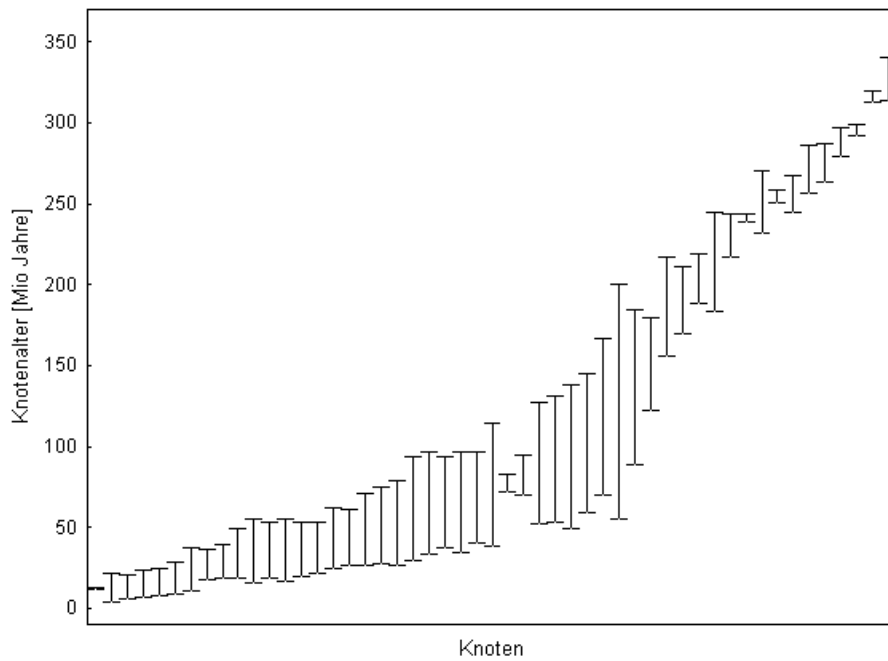


Abbildung 12: Divergenzzeiten-Intervallplots, zeigen die Diskrepanz (Maximum, Minimum Alter) der Datierungen zwischen vier unterschiedlichen „Relaxed-clock-models“ CL, LN, WN, UGAM des Datensatzes 3542.

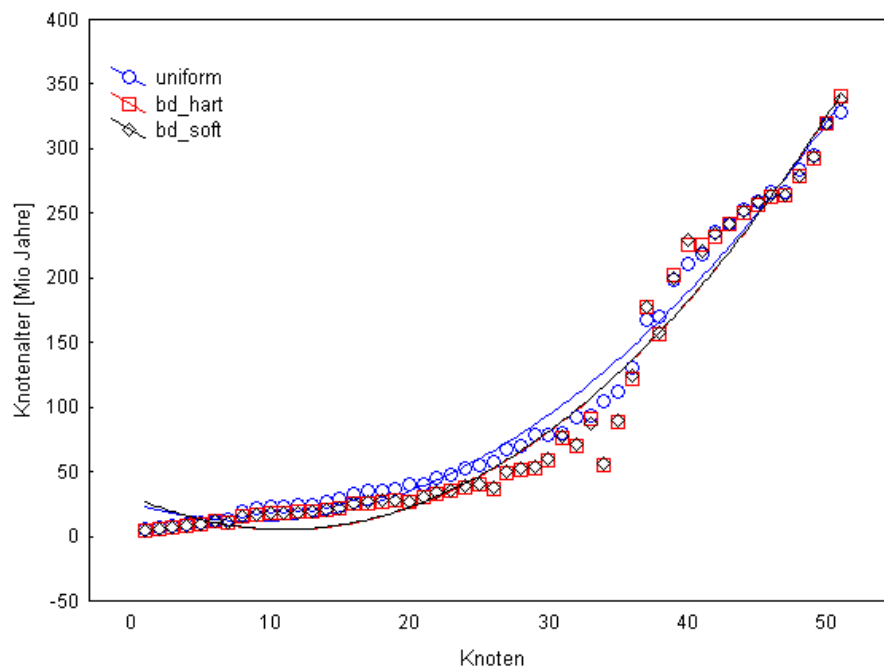


Abbildung 13: Auswirkung verschiedener „Divergence-times-priors“ („Uniform“ versus „Soft“ und „Hard-bounds“) auf die Knotenalter des Datensatzes 3542 unter dem „Relaxed-clock-model“ UGAM (Drummond et al. 2006), berechnet mit dem Programm Phylobayes3.2d (Lartillot et al. 2009).

beträchtliche Abweichungen der Knotenalter je nach verwendetem Modell. Besonders auffällig ist die Diskrepanz der Knotenalter zwischen dem „White-noise“-Modell und den übrigen Modellen. Das „White-noise“-Modell erzeugt im Mittel die ältesten Divergenzzeiten ( $\bar{x} = 130,5$  Mio. Jahre). Mit zunehmender Komplexität der Modelle werden die Divergenzzeiten jünger (LN  $\bar{x} = 109,3$  Mio. Jahre; CL  $\bar{x} = 102,9$  Mio. Jahre). Die jüngsten Knotenalter generiert das Modell UGAM ( $\bar{x} = 98$  Mio. Jahre).

Die Auswirkung verschiedener „Divergence-times-priors“ auf die Knotenalter ist weniger gravierend als der Einfluss unterschiedlicher „Relaxed-clock-models“. Abbildung 13 zeigt den Vergleich der Knotenalter zwischen „Uniform-hard-bounds“ versus „Birth-death-hard-bounds“ sowie „Birth-death-soft-bounds“ versus „Birth-death-hard-bounds“.

Die Auswirkung harter oder weicher Kalibrierungsgrenzen auf die Knotenalter ist für den analysierten Datensatz unerheblich. Der U-Test beweist, dass die Knotenalter unter „Hard“ und „Soft-bounds“ nicht signifikant von der Nullhypothese abweichen ( $p > 0,05$ ). Deutlicher ist der Unterschied zwischen den Priors „Uniform-hard-bounds“ versus „Birth-death-hard-bounds“. Das durchschnittliche Knotenalter des Baumes ist unter dem uniformen Divergenzzeiten Prior um 7,3 Mio Jahre älter als unter dem Birth-death-Prior. Dennoch lässt sich kein signifikanter Unterschied nachweisen (U-Test,  $p > 0,05$ ).

#### 4.2.2 Divergenzzeiten der Amnioten

Die Amnioten-Phylogenie des Datensatzes 3542 wurden mit zehn Kalibrierungspunkten geeicht und unter der Annahme einer gelockerten molekularen Uhr („Uncorrelated-gamma-multipliers“, Drummond et al. 2006) ein bayesianisches Chronogramm berechnet (Abbildung 15). Im Fokus der Untersuchung stehen die Divergenzzeiten der Serpentes und hier insbesondere die Radiation der Viperidae. Durch den Verzicht auf Kalibrierungspunkte in der Kronengruppe der Viperidae ist es möglich, Hypothesen zu molekulargenetischen Divergenzzeiten zu testen und Fossilüberlieferungen auf Konkordanz zu überprüfen. Ergebnisse der molekularen Datierung sind für ausgewählte Knoten mit Angabe der Konfidenzintervalle in Tabelle 12 zusammengefasst.

Das Alter des Stammlinienvertreters der Serpentes wird von der bayesianischen Analyse auf 158 Mio. Jahre datiert. Der letzte gemeinsame Vorfahre der Alethinophidia existierte vor rund 90 Mio. Jahren, bevor sich die Alethinophidia in Riesenschlangenartige (Henophidia) und moderne Schlangen (Caenophidia) aufspalteten. Die Radiation moderner Schlangen begann im Sennonium der oberen Kreide vor rund 71 Mio. Jahren. Viperidae trennten sich von den übrigen Colubroidea in der oberen Kreide vor 59,5 Mio. Jahren. Der Split *Naja/Bungarus* innerhalb der Colubroidea wird auf 35,1 Mio. Jahre geschätzt und

afrikanische Kobras wurden in Übereinstimmung mit paläotektonischen Ereignissen von ihren asiatischen Verwandten vor 18,5 Mio. Jahren separiert.

Die Knotendivergenzzeiten der Viperidae sind in Abbildung 14 graphisch dargestellt. Die Radiation der Viperidae in Crotalinae und Viperinae fällt auf das Eozän (ca. 50 Mio. Jahre) im späten Tertiär.

Tabelle 12: Berechnete Divergenzzeiten wichtiger Knoten und Kladen (MRCA) unter dem UGAM-Modell (Drummond et al. 2006) mit Angabe der Konfidenzintervalle (Datensatz 3542).

Knoten	berechnete Divergenzzeit (Mio. Jahre) mit 95% Konfidenzintervallen		
	Mittelw.	infer. 95%	sup. 95%
MRCA Lepidosaurier	279,5	261,7	292,8
MRCA Archosauromorpha	264,6	242,7	280,7
MRCA Squamata	264,1	242,7	280,7
Split Acrodonta/Serpentes	234,2	206,2	255,1
Split <i>Iguana/Lacerta</i>	221,4	81,5	265,3
MRCA Anguimorpha	199,5	155,8	239,0
MRCA Serpentes	158,2	129,5	188,2
MRCA Alethinophidia	90,1	69,7	114,9
MRCA Caenophidia	71,0	55,8	91,4
Split Colubroidea/Viperidae	59,5	46,2	76,0
MRCA Henophidia	53,6	31,7	81,0
Split <i>Naja/Bungarus</i>	35,1	24,8	47,6
Split <i>nigricollis/naja</i>	18,5	10,7	29,3

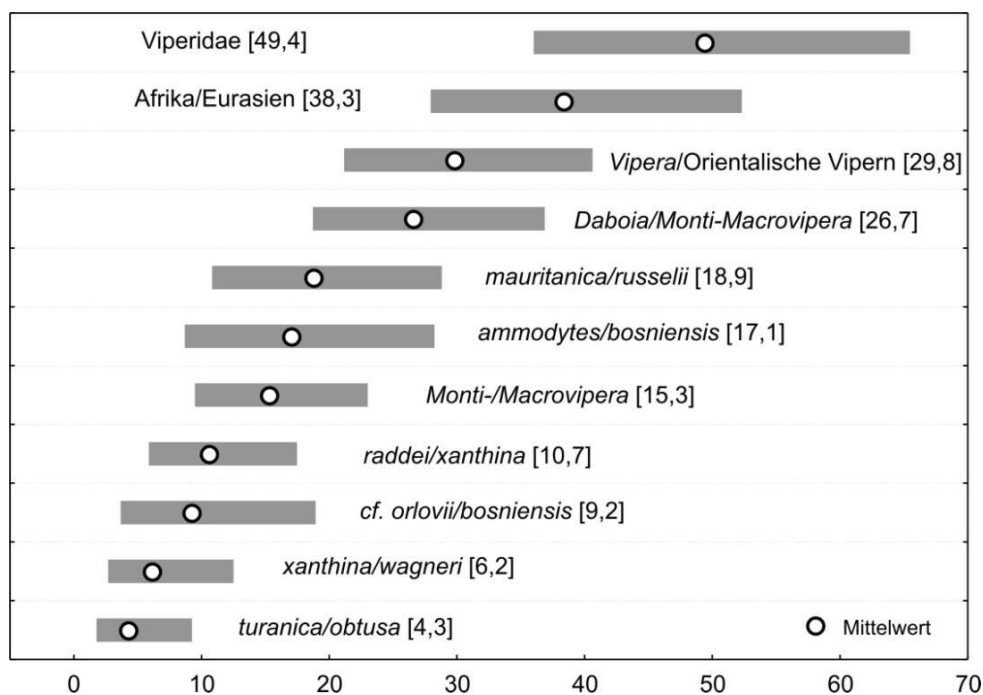


Abbildung 14: Divergenzzeiten ausgewählter Knoten (Datensatz 3542) unter dem UGAM-Modell (Drummond et al. 2006), mit Angabe der 95% Konfidenzintervalle (graue Balken).

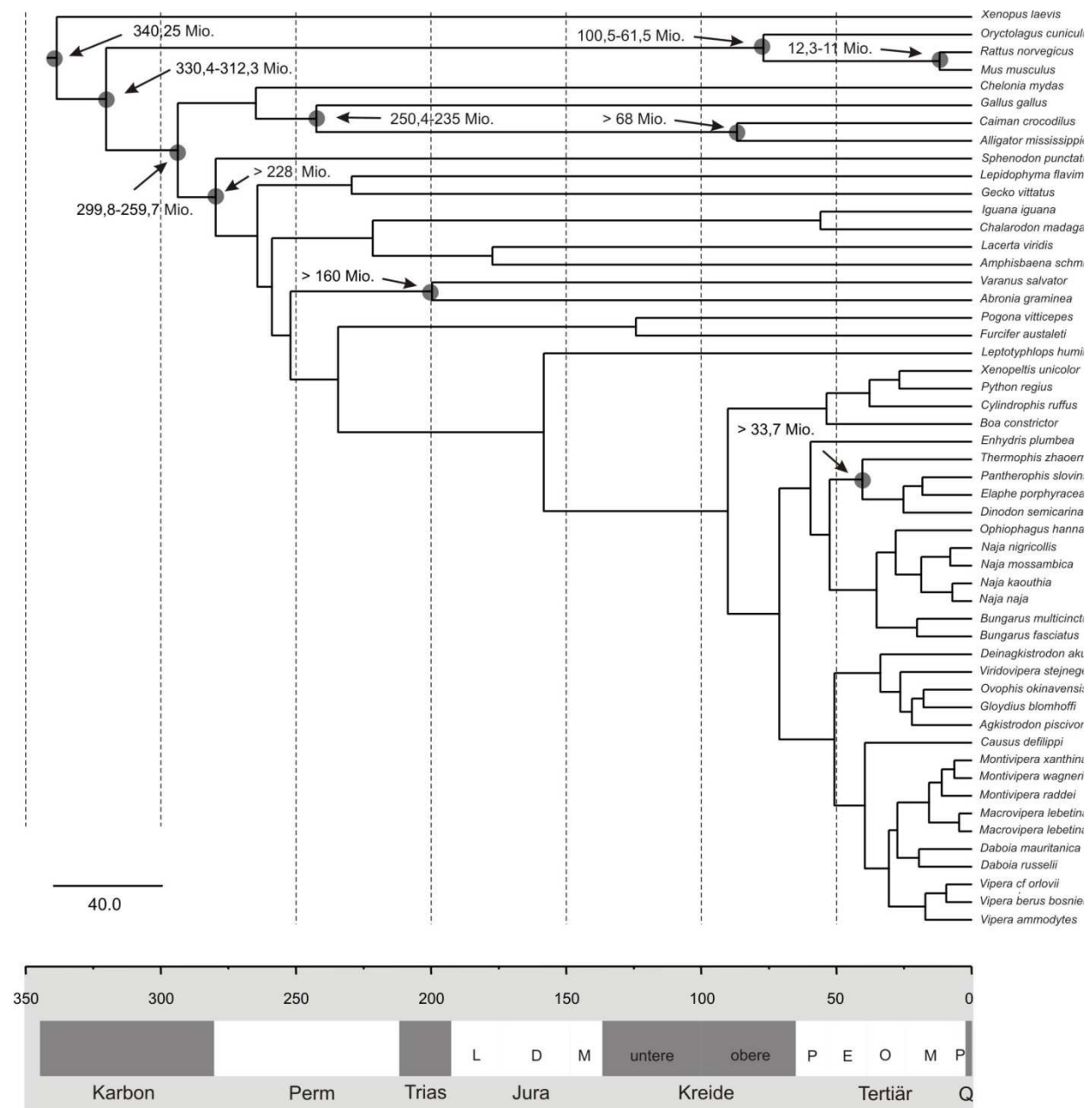


Abbildung 15: Chronogramm für die Großgruppen der Squamata und Archosauromorpha (Datensatz 3542), unter der Annahme der gelockerten molekularen Uhr UGAM (Drummond et al. 2006), berechnet mit dem Programm Phylobayes3.2d (Lartillot et al. 2009). Die bayesianische Analyse basiert auf den Aminosäuresequenzen von 11 verketteten proteincodierenden Genen des mitochondrialen L-Stranges (ohne ATP8). Zur Eichung der molekularen Phylogenie verwendete ich 10 ausschließlich hinreichend gut belegte paläontologische Befunde (gekennzeichnet durch grau unterlegte Kreise). Die für Schlangen limitierte Verfügbarkeit sequenzierter Mitogenome schränkt die Auswahl potentieller Kalibrierungspunkte im Vorhinein ein. Mit dem Ziel, die Divergenzzeiten der Viperinae unabhängig von paläontologischen Befunden zu überprüfen und Zirkelschlüsse zu vermeiden, setzte ich für diese Klade keine zeitlichen Limits. Als Priors für die Kalibrierung interner Knoten wurden „Soft-minimum“ und „Soft-maximum-bounds“ gewählt und das Alter der Wurzel (340,25 Mio. Jahre) einer Lognormal-Verteilung angepasst (siehe Material und Methoden).

### 4.3 Diskussion

Fossilien sind essentiell als externe Eichpunkte für die Kalibrierung molekularer Uhren (z.B. Reisz & Müller 2004). Ihre Verwendungen als Chronometer sind jedoch nach Benton & Donoghue (2007) häufig weit entfernt von einer adäquaten Nutzung. Für den analysierten Datensatz wurden daher ausschließlich nach aktuellem Kenntnisstand validierte Eichpunkte verwendet. Die hohe Qualität der von Benton & Donoghue (2007) vorgeschlagenen Eichpunkte ermöglicht eine Kalibrierung mit Maximum- und Minimumgrenzen. Alle zusätzlichen Eichpunkte wurden nur als Minimumgrenzen verwendet. Der Großteil der Eichpunkte liegt im vorliegenden Chronogramm (Abbildung 15) mit zwei Ausnahmen außerhalb des Squamaten-Subzweiges. Daher basieren die berechneten Divergenzzeiten innerhalb der Squamaten grundsätzlich auf Zeitvorgaben in den Außengruppen. Die fossile Ahnenreihe der Squamaten ist unvollständig überliefert. Große Lücken in der Nachweiskette verhindern, dass Divergenzzeiten zweier Schwestergruppen realistisch rekonstruiert werden können (Evans 2003). Die berechneten Zeiten sind daher in den meisten Fällen fossil nicht abgesichert.

Kumazawa (2007) und Okoajima & Kumazawa (2009) schätzen das Alter des letzten gemeinsamen Vorfahren rezenter Squamaten auf ca. 240 Mio. Jahre. Deutlich jünger sind die Schätzungen von Hugall et al. (2007) und Pyron (2009). In den genannten Arbeiten liegt das Alter der Squamaten je nach verwendetem Datensatz und Kalibrierungspunkten zwischen 171 und 208 Mio. Jahren. Nach Evans (2003) existiert kein sicherer Squamaten-Nachweis aus der Zeit vor dem frühen Jura. Die von mir vorliegende Schätzung datiert den Ursprung rezenter Squamaten auf das Perm. Damit ist die Schätzung erheblich älter als die der genannten Autoren.

Über das Alter der Schlangen liegen nur wenige Hochrechnungen vor, die jedoch keinen Konsens erreichen. Die Berechnungen datieren den letzten gemeinsamen Vorfahren zwischen Alethinophidia und Scolecophidia auf ein Zeitfenster zwischen Oberjura bis Oberkreide.

Wiens et al. (2006) datieren die basale Divergenz zwischen Scolecophidia und Alethinophidia auf 131 Mio. Jahre. Kumazawa (2007) errechnet ein Alter für den letzten gemeinsamen Vorfahren zwischen Leptotyphlopidae und Alethinophidia von ca. 110 Mio. Jahren. Hugall et al. (2007) schätzen das Knoten-Alter zwischen *Ramphotyphlops* vs. Alethinophidia auf einen äquivalenten Zeitraum von 96-109 Mio. Jahren. Alle genannten Publikationen datieren den Ursprung der Serpentes auf die Kreidezeit. Deutlich älter als die bisherigen Berechnungen ist das von Vidal et al. (2009) errechnete Alter für den Knoten Scolecophidia vs. Alethinophidia. Die Divergenzzeit der beiden Gruppen liegt mit 160 Mio. Jahren auf einer vergleichbaren Zeitmarke wie das in der vorliegenden Arbeit errechnete



Alter von 158 Mio. Jahren. In einer morphologischen Analyse rezenter und fossiler Schlangentaxa datieren Wilson et al. (2010) den letzten gemeinsamen Vorfahren von *Scolecophidia*, *Najash rionegrina*, *Dinilysia patagonica* und der *Alethinophidia* auf ca. 125 Mio. Jahre.

Das älteste sicher identifizierte Schlangenfossil stammt nach Rage & Escuillié (2003) aus Schichten des Albium (112-99,6 Mio. Jahre). Die einzelnen Wirbelfragmente wurden in Algerien gefunden (Cuny et al. 1990) und repräsentieren wahrscheinlich eine Lapparentophiidae (Rage & Escuillié 2003). Weitere Arten *Pachyrhachis*, *Eupodophis*, *Haasiophis*, *Pachyophis* und *Mesophis* stammen aus der nachfolgenden Stufe des Cenomanium und sind nur wenig jünger (99,6-93,6 Mio. Jahre). *Coniophis* aus der Cedar-Mountain-Formation in Utah (Mittlere Kreide) stellt mit 98,5 Mio. Jahren die älteste radiometrisch datierte Schlange dar (Gardner & Cifelli 1999).

Es ist naturgemäß sehr unwahrscheinlich, dass es sich bei den bekannten Fossilien um die ersten Vertreter der Serpentes gehandelt hat, zumal die Pachyophiidae der Kronengruppe der Macrostromata angehörten und keine primitiven Vertreter der Schlangen waren (Wilson et al. 2010). Folglich dürften die molekularen Schätzungen von Hugall et al. (2007) und Kumazawa (2007) dem tatsächlichen Alter der Schlangen nicht entsprechen.

Der kürzlich gemachte Fund eines Schlangenfossils aus Patagonien hat die Debatte um die Entstehung der Schlange erneut entfacht und ihr neue Impulse verliehen. Bisher nahm man an, Schlangen hätten im Verlaufe der Evolution graduell ihre Hinterextremitäten reduziert (Underwood 1977). Die kreidezeitlichen marinen Arten *Pachyrhachis problematicus*, *Haasiophis terrasanctus* und *Eupodophis descouensi* wurden bisher als basale Schlangen eingestuft, deren gut entwickelten Hinterextremitäten und Anpassungen an die Macrophagie als Beleg für die Verwandtschaft zu Mosasauriern galt (z.B. Caldwell & Lee 1997). Die Hypothese des Schwestergruppenverhältnisses legte die Vermutung nahe, Schlangen hätten einen marinen Ursprung. Die kritische Evaluierung der anatomischen Merkmale der Extremitäten tragenden Gattungen ergab jedoch, dass die Hypothese eines marinen Ursprunges und die verwandtschaftlichen Beziehungen zu Mosasauriern auf schwachen Merkmalen fußen (Zaher et al. 2009). Die fossilen marinen Schlangen *Pachyrhachis*, *Haasiophis* und *Eupodophis* ergeben demnach sogar die Schwestergruppe moderner macrostomater Schlangen. Die neuen Erkenntnisse befürworten ein Szenario, in dem sich die Reduktion und der Verlust der Hinterextremitäten parallel unter rezenten Schlangenlinien ereignet haben (Zaher & Rieppel 1999, Greene & Cundall 2000).

Ein erst kürzlich von Apesteguía & Zaher (2006) beschriebenes Fossil hat deutlich primitivere Merkmale als alle zuvor beschriebenen Schlangenfossilien. Das Fundstück

stammt von einer terrestrischen Fossilagerstätte und hatte robuste funktionsfähige Hinterextremitäten außerhalb des Brustkorbes. *Najash rionegrina* war eine unterirdische oder oberflächennah wühlende Schlange. Ihre Anatomie und Lebensweise sprechen gegen die Hypothese eines marinen Ursprunges der Schlangen. Cladistische Untersuchungen platzieren sie als Schwesterart zu allen fossilen und rezenten Schlangen (Apesteguía & Zaher 2006).

Molekulare Schätzungen für den letzten gemeinsamen Vorfahren der modernen Schlangen, die Alethinophidia, sind inkonsistent und liegen zwischen 45 Mio. Jahren (Kumazawa 2007), 50 Mio. Jahren (Hugall et al. 2007), 70 Mio. Jahren (Wüster et al. 2008), 87 Mio. Jahren (Sanders et al. 2010) und 121 Mio. Jahren (Noonan & Chippindale 2006a,b). Die morphologische Studie von Wilson et al. (2010) datiert den Ursprung der Gruppe auf 120 Mio. Jahren.

Die molekulare Divergenzzeit der Alethinophidia ist teilweise klar im Widerspruch zu den paläontologischen Daten. Boidae bewohnen seit mindestens 60 Mio. Jahren die tropischen Regionen des Globus (z.B. Head et al. 2009). Moderne Schlangen sind somit fossil bereits aus älteren Schichten überliefert als die von Kumazawa (2007) und Hugall et al. (2007) berechneten Divergenzzeiten. Rage & Werner (1999) berichten von weitaus älteren Colubroid-ähnlichen Fossilien aus dem Cenoman (92,7-100,5 Mio. Jahre), deren taxonomische Identifikation jedoch umstritten ist (Head et al. 2005).

Sofern die von Wilson et al. (2010) rekonstruierte Stellung fossiler Madtsoiidae und Pachyophiidae innerhalb der Alethinophidia richtig ist, stehen auch die Divergenzzeiten von Wüster et al. (2008) und Sanders et al. (2010) im Konflikt mit den paläontologischen Daten. *Sanajeh indicus* (Madtsoiidae) stammt aus den oberen kreidezeitlichen Schichten Indiens und weist ein Alter von 65 Mio. Jahren auf (Wilson et al. 2010). Zu den Pachyophiidae gehören die ältesten bekannten Schlangenfossilien. *Haasiophis*, *Mesophis*, *Pachyophis*, *Pachyrachis* und *Simoliophis* sind fossil aus dem Cenomanium überliefert. *Coniophis* (Aniliidae), ebenfalls ein Vertreter moderner Schlangen, ist mittels der Radiokarbondatierung auf 98,5 Mio. Jahre datiert worden. Moderne Schlangen sind, nach dem Fossilrekord zu urteilen, deutlich älter als 100 Mio. Jahre.

Das Zeitfenster, in dem die Stammlinie der Vipern von den übrigen Caenophidia divergierte, umfasst nach publizierten Werten ein Intervall zwischen 25 Mio. (Kumazawa 2007) bis ca. 70 Mio. Jahren (Wüster et al. 2008) (vergl. auch Tabelle 13). Die ältesten fossilen Viperiden stammen nach Szyndlar & Rage (1999) aus der Säugerzone MN1 (24-22 Mio. Jahre). Zu diesem Zeitpunkt waren die Arten bereits in die wesentlichen evolutionären Viper-Linien diversifiziert. Das belegt *Vipera antiqua* aus der deutschen Fossilagerstätte in Weisenau (MN1), die von Szyndlar & Rage (1999) dem *Vipera aspis*-Komplex zugerechnet wird.

Colubroidea sind seit mindestens 33,7 Mio. Jahren fossil überliefert (Rage et al. 1992). Die Schätzung der Viperiden auf 25 Mio. Jahre durch Kumazawa (2007) dürfte demnach deutlich zu jung sein. Die hier berechneten Knotenalter innerhalb der Viperiden sind mehr oder weniger in breiter Übereinstimmung zu den ermittelten Werten von Wüster et al. (2007, 2008) und Pook et al. (2009).

Die Radiation rezenter Viperidae (49,4 Mio. Jahre) sowie das Alter des MRCA der Viperinae (39,4 Mio. Jahre) bestätigen die Analysen von Wüster et al. (2008). Interne Knotenalter der Viperinae sind jedoch zu den von Wüster et al. (2008) ermittelten Werten diskrepant und tendenziell etwas älter. Dies sind im Folgenden die vier Splits A) *Daboia* vs. *Macro-, Montivipera* mit 23 Mio. Jahren (Wüster et al. 2008) gegen 27,4 Mio. Jahre der vorliegenden Analyse (vA), B) *Daboia russelii* vs. *Daboia mauritanica* mit 14 Mio. Jahren (Wüster et al. 2008) gegen 19,4 Mio. Jahre der vA, C) *Vipera ammodytes* vs. *Vipera berus* mit 12 Mio. Jahren (Wüster et al. 2008) gegen 17 Mio. Jahre der vA und D) *Macrovipera* vs. *Montivipera* mit 11 Mio. Jahren (Wüster et al. 2008) gegen 15,6 Mio. Jahre der vA.

Trotz des beinahe vollkommenen Verzichtes auf Kalibrierungspunkte innerhalb der Squamaten – einzige Ausnahme, Colubridae mit einem Mindestalter von 33, 7 Mio. Jahren – sind die Divergenzzeiten innerhalb der Viperinae in erstaunlich hoher Übereinstimmung mit vikariierenden geodynamischen Prozessen der zirkum-mediterranen Region (siehe Kapitel 8). Besonders hervorzuheben ist die Aufspaltung der Gattung *Daboia* in eine afrikanische (*mauritanica*) und asiatische (*russelii*) Schwesterlinie vor 19,4 Mio. Jahren, die mit der Unterbrechung der *Gomphotherium*-Landbrücke im frühen Miozän korreliert. Die Landverbindung war in dem Zeitraum zwischen 22,1 bis 16 Mio. Jahren mindestens zu zwei Zeitpunkten für Squamaten passierbar (Böhme 2003), bevor sie kollabierte. In dieses Zeitfenster fällt auch der Split zwischen afrikanischen (*Naja nigricollis*) und asiatischen Kobras (*Naja naja*) vor 18,5 Mio. Jahren. Bestätigt wird die Divergenzzeit durch Fossilfunde der Gattung *Naja*. Die ältesten Fossilien mit autapomorphen Merkmalen asiatischer Kobras (Szyndlar & Rage 1990) sind kurze Zeit nach Unterbrechung der *Gomphotherium*-Landbrücke entstanden (Wüster et al. 2007).

Hohe Übereinstimmungen zwischen Divergenzzeiten und korrespondierenden geologischen Ereignissen lassen sich auch für die Splits zwischen *Macrovipera* vs. *Montivipera* und *Montivipera xanthina* vs. *Montivipera raddei* nachweisen. Die Trennung der beiden Schwestergattungen *Macrovipera* und *Montivipera* vor 15,6 Mio. Jahren korreliert mit der Insellage des Vorderen Orients im mittleren Miozän (Langhium) vor 16-15 Mio. Jahren (Popov et al. 2004). Eine offene Seeverbindung zwischen Paratethys und Indischem Ozean entlang der Bitlis-ostanatolischen Faltungszone (Rögl 1999) separierte im mittleren

Tabelle 13: Divergenzzeiten ausgewählter Schlangen-Subkladen (Serpentes) im Vergleich, NC=Nukleotide, AA=Aminosäuren, MP=morphologische Parameter.

Quelle	Verwendetes Programm	Datenquelle	Scolecophidia vs.	Henopidia vs.	Viperidae vs.	Crotalinae vs.	
			Alethinophidia	Caenophidia	Caenophidia	Viperinae	
			MRCA Serpentes	MRCA Alethinophidia		MRCA Viperidae	MRCA Viperinae
Hugall et al. (2007)	r8s	NC	109	50	—	—	—
Kumazawa (2007)	PAML	NC	~110	~45	~25	—	—
Nagy et al. (2003)	?	NC	—	—	46	—	—
Noonan & Chippindale (2006)	MULTIDISTRIBUTE	NC	121	—	—	—	—
Sanders et al. (2008)	BEAST	NC	102,3	62,1	48,9 (38,5)	—	—
Sanders et al. (2010)	BEAST	NC	112,6	87,4	40,1 (38,5)	—	—
Vidal et al. (2009)	PAML	NC	159,9	105,8	54,3	—	—
Wilson et al. (2010)	PAUP	MP	~128	~120	—	—	—
Wüster et al. (2007)	BEAST	NC	—	—	~70	~55	~48
Wüster et al. (2008)	BEAST	NC	—	—	61,5	47,4	39,7
Pook et al. (2009)	BEAST	NC	—	—	~55	~44	~37,5
Vorliegende Studie	Phylobayes	AA	158,2	90,1	59,5	49,4	38,3

Serravallium vor 13-12,2 Mio. Jahren die Stammart von *Montivipera* in eine westliche (*xanthina*) und eine östliche (*raddei*) Gruppe. Das Ereignis stimmt mit der geschätzten Divergenzzeit von 11 Mio. Jahren in etwa überein. Innerhalb der Grubenottern datieren Wüster et al. (2008) die basale Cladogenese des *Deinagkistrodon*-Zweiges auf 30 Mio. Jahre, im Vergleich zu 33,6 Mio. Jahren der vorliegenden Studie. Dieselben Autoren schätzen die Verzweigung zwischen den neuweltlichen (*Agkistrodon*) und altweltlichen (*Ovophis*, *Gloydius*) Dreiecks-Köpfen auf 24 Mio. Jahre, versus 21,9 Mio. Jahre der hiesigen Berechnung. Mehrere Autoren postulieren jedoch eine sehr viel frühere Kolonisation der Neuen Welt durch Grubenottern in der Zeitspanne der späten Kreidezeit bis ins frühe Tertiär (Gutberlet & Harvey 2004). Nach Wüster et al. (2008) ist die Besiedlung der Neuen Welt über die Bering-Landbrücke im späten Oligozän bis frühen Miozän am wahrscheinlichsten.

Fossilüberlieferungen sind ein Schlüsselfaktor für die zeitliche Kalibrierung von Phylogenien (Benton & Donoghue 2007). Drei Faktoren entscheiden über die Eignung von Fossilien als Chronometer: erstens die Zuverlässigkeit der phylogenetischen Inferenz unter Einschluss der Referenztaxa, zweitens die Korrektheit der taxonomischen Identifizierung und drittens die Akkuratheit der stratigraphischen Altersdatierung. Die meisten Schlangenfossilien bestehen aus unvollständigen Skeletten. Bei den überlieferten Fragmenten handelt es sich meist um isolierte Wirbel, die dazu häufig beschädigt sind (Szyndlar & Rage 1999). Die Wirbelmorphologie lebender Schlangen wurde nur bei einer geringen Zahl von Taxa ausführlich untersucht und ihre individuellen und ontogenetischen Veränderungen sind kaum bekannt (z.B. Head 2005). Die fossile Ahnenreihe der Viperiden ist lückenhaft und die taxonomische Zuordnung der Fundstücke nicht immer eindeutig. Wüster et al. (2008) und Pook et al. (2009) kalibrierten daher ihre Stammbäume hauptsächlich mit Eichpunkten

außerhalb der Viperinae. Für den Subzweig der Viperinae nehmen sie eine Divergenzzeit von 20 Mio. Jahren an.

Ein direkter Vergleich der Knotendivergenzzeiten zwischen Analysen verschiedener Autoren ist wenig sinnvoll. Sehr unterschiedlich sind die verwendeten Datenquellen, Kalibrierungspunkte und -techniken sowie die verwendeten Algorithmen zur Modellierung von Substitutionsprozessen und ebenfalls die zugrundeliegenden Hypothesen der molekularen Uhren. Folglich sind sich widersprechende Divergenzzeiten unausweichlich. Dennoch zeigt das vorliegende Chronogramm eine relativ hohe Übereinstimmung zu den Analysen von Wüster et al. (2008) und Pook et al. (2009). In geologischen Zeiträumen betrachtet sind die Abweichungen nur gering. Die Mittelwerte der vorliegenden Berechnungen liegen innerhalb der Konfidenzintervalle der genannten Autoren.

Die vergleichenden Untersuchungen geben Auskunft über die Zuverlässigkeit der Berechnungen und ihre zugrundeliegenden evolutionären Annahmen. Es ist aber nicht beabsichtigt, Schieflagen („Bias“) der Divergenzzeiten und die Glaubwürdigkeitsintervalle zu analysieren. Die Ergebnisse der Abbildung 10 bis Abbildung 13 illustrieren die gravierenden Auswirkungen unterschiedlicher „Relaxed-clock-models“ auf die Knotendivergenzzeiten. Alle vier verwendeten relaxierten Modelle erzeugen unterschiedliche Knotendivergenzzeiten wegen unterschiedlicher evolutionärer Annahmen, von denen das Modell „White-noise“ tendenziell die jüngsten Knotenalter berechnet. Besonders diskrepant sind die Knotenalter in der Baummitte (Abbildung 12). In Richtung der distalen Enden des Baumes nivellieren sich die Unterschiede, weil die Divergenzzeiträume durch Eichpunkte fixiert sind. Ungleiche Annahmen zur Ratenheterogenität zwischen verschiedenen Uhr-Modellen verschieben das Knotenalter entlang des Baumes. Knoten in der Baummitte, die eine geringere Anzahl Eichpunkte aufweisen, sind aufgrund der Ratenheterogenität in der Zeitebene in beide Richtungen leichter verschiebbar und somit variabler.

Für die Berechnung von Chronogrammen gibt es kein ideales Modell und keine Möglichkeit, das für den Datensatz richtige relaxierte Modell durch einen rigorosen statistischen Test zu ermitteln, wie das im Fall der Nukleotid-Evolutionsmodelle der Fall ist. Lepage et al. (2007) bemerken hierzu: „*However, it is unclear which model has the best fit to real data and should therefore be used to perform molecular dating.*“ (S. 2669).

Die einzige Möglichkeit, die Divergenzzeiten unter objektiven Kriterien zu überprüfen, besteht darin, die Knotenalter mit realen, datierten biologischen oder geographischen Ereignissen zu korrelieren und das Modell, das den beobachteten Tatsachen am ehesten entspricht, als das geeignetste auszuwählen. Es ist daher ein dringendes Anliegen der

Phylogenie, Methoden zur Auswahl adäquater relaxierter Modelle zu finden (Lepage et al. 2007).

Bisher gab es wenige Studien, die die Performance verfügbarer relaxierter Uhrmodelle verglichen haben. Thorne und Kishino (2002), Ho et al. (2005), Drummond et al. (2006) haben den Versuch unternommen, verschiedene Modelle dadurch zu validieren, wie gut sie in der Lage waren, bekannte Raten und Daten simulierter Analysen zu reproduzieren. Lepage et al. (2007) messen die Adäquatheit der Modelle („Model-fit“) mithilfe der marginalen Likelihoods  $P(D|M)$ .

Unter den hier verglichenen unkorrelierten Modellen haben die Liniendivergenzzeiten unter dem Modell UGAM (Drummond et al. 2006) die höchste Korrelation zu geotektonischen Ereignissen. Obwohl der Relaxationsprozess nach Untersuchungen von Lepage (2007) am besten durch die autokorrelierten Modelle LogN und CIR unterstützt wird, zeigen die mit dem Modell UGAM berechneten Knotenalter höhere Übereinstimmung zu paläotektonischen Kalibrierungsereignissen, als unter dem autokorrelierten Modell LogN (Kishino et al. 2001). Unter den drei von Lepage et al. (2007) verglichenen Modellen mit „Branchwise“-Eigenschaften (UGAM, UExp, WN) ist UGAM das am besten angepasste.

Der Einfluss unterschiedlicher „Divergence-times-priors“ auf die Knotenalter ist in der vorliegenden Analyse unter dem Modell UGAM (Drummond et al. 2006) vernachlässigbar gering. Lepage et al. (2007) untersuchten auch den Einfluss alternativer „Divergence-times-priors“ auf die Knotenalter. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass keiner der Priors überlegen ist, weil die für den Nachweis verwendeten Bayes-Faktoren stark vom Datensatz beeinflusst sind. Brown & Yang (2010) fanden, dass posteriore Divergenzzeiten sensitiv auf unterschiedliche Birth-death-Priors reagieren.

Nach Egan & Doyle (2010) sind es die Evolutionsraten der untersuchten Gene, die den größten Einfluss auf die Variabilität der Divergenzzeiten ausüben. Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangten Smith & Eyre-Walker (2003). Auch das Abschätzen von Distanzkorrekturen zwischen unterschiedlichen Sequenzen durch Substitutionsmodelle hat einen elementaren Einfluss auf die resultierenden Divergenzzeiten (z.B. Perez-Lozada et al. 2004, Smith et al. 2006) genauso wie die verwendeten Uhr-Hypothesen.

Werden falsche Modellannahmen für die Distanzkorrektur gemacht, oder wird die Annahme der Evolutionsraten einzelner Linien verletzt, liegt es auf der Hand, dass auch relaxierte Uhren zu einem „Bias“ der Posterior-Intervalle führen.

Die Präzision der Divergenzzeitberechnungen korreliert auch bei relaxierten Uhren negativ mit dem Knotenalter. Basale Knoten sind weniger exakt kalkulierbar als apikale Knoten, weil sich Mutationen im Verlaufe der Zeit ansammeln (Egan & Doyle 2010).

Relaxierte Uhren sind globalen Modellen in Präzision und Akkuratheit überlegen (Battistuzzi et al. 2010) oder im Fall junger Phylogenien zumindestens gleichwertig (Egan & Doyle 2010). Auch die Summe der Mutationen hat einen Einfluss auf die Qualität der Berechnungen. Je mehr Gene in die Analysen einbezogen werden, desto genauer und präziser sind die Berechnungen und Glaubwürdigkeitsintervalle (Battistuzzi et al. 2010).

Erstaunlicherweise hat die bloße Anzahl der Kalibrierungspunkte in simulierten Analysen keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Chronogramme. Eine Steigerung der Kalibrierungspunkte führt nicht automatisch zu einem besseren Resultat. Entscheidend ist die Qualität des Eichpunktes (Battistuzzi et al. 2010). Ungeachtet der Güte des Kalibrierungspunktes, ist die Genauigkeit der Knotendivergenzzeiten von der Nähe zum Kalibrierungspunkt beeinflusst. Knotenalter in unmittelbarer Nachbarschaft zum Chronometer sind exakter als weit entfernte Knoten (Battistuzzi et al. 2010, Egan & Doyle 2010). Möglicherweise ist dieser Effekt maßgeblich für die große Variabilität der Knotenalter verantwortlich.

Die zahlreichen neuen Kalibrierungstechniken, wie sie beispielsweise in das Programm BEAST implementiert sind, ermöglichen es, Fossil-Informationen adäquat zu nutzen, täuschen meines Erachtens allerdings eine illusorische Präzision vor.

## 5 Phylogenie eurasischer Viperinae

### 5.1 Einleitung

In der europäischen Herpetofauna hat kaum eine andere Artengruppe ähnlich viel Aufmerksamkeit wie die der Giftschlangen (Obst 1982) und eine vergleichsweise große literarische Tradition. Zahlreiche wissenschaftliche und autodidaktische Monographien widmen sich dieser Tiergruppe (z.B. Schwarz 1936, Psenner 1940, Joger 1984, Bruno 1985, Brodmann 1987, De Smedt 2001, Joger & Stümpel 2005c, Phelps 2010). Eurasische Vipern<sup>4</sup> sind Modellorganismen für ökologische Untersuchungen (Shine & Bonnet 2000) sowie Life-history-Untersuchungen (z.B. Madsen et al. 1999, Niskanen & Mappes 2005). Ihre Gifte sind von epidemiologischer und pharmazeutischer Bedeutung (z.B. Mebs 2000). Die Anzahl der jährlichen Vergiftungsunfälle in Europa hat ein deutliches Süd-Nord Gefälle (Chippaux 1998) und liegt bei 2,5/100.000 Einwohner in Schweden, 3,0/100.000 in der Schweiz und 5,2/100.000 in Kroatien. Im asiatischen Raum, wo zusätzlich Elapiden und Crotaliden für die Vergiftungsunfälle verantwortlich sind, können 300 Menschen pro 100.000 Einwohner (Sri Lanka) betroffen sein. Indien beklagt nach Schätzungen jedes Jahr 30.000 Giftschlangentote. In Europa und dem Mittleren Osten werden unter 45.000 Bissopfern im Jahr 130 Todesfälle registriert (Chippaux 1998). Viperiden sind ein ernst zu nehmendes epidemiologisches Problem, besonders in Schwellen- und Drittwelt-Ländern, in denen keine adäquate medizinische Versorgung gewährleistet ist (Chippaux 2008). Viperngifte sind jedoch Bürde und Segen zugleich. Ihre Toxine werden in der klassischen Schulmedizin genauso wie in der Homöopathie als Therapeutikum eingesetzt.

Die Familie der Vipern (Viperidae: Grubenottern und echte Vipern) umfasst weltweit etwa 270 Arten, davon werden 40-50 Arten dem eurasischen Formenkreis zugerechnet (David & Ineich 1999).

Robuste phylogenetische Hypothesen sind die Voraussetzung für nahezu alle Forschungsdisziplinen der Biologie, essentiell für den Naturschutz und bei Gifttieren für eine effektive Antiserumtherapie und -herstellung notwendig. Die Taxonomie eurasischer Viperinae wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Bis in die achtziger Jahre des 20sten Jahrhunderts wurden paläarktische Viperinae<sup>5</sup>, ausgenommen *Eristicophis*, *Pseudocerastes*, *Echis* und *Cerastes*, in der Gattung *Vipera* sensu Laurenti (1768) vereint

---

<sup>4</sup> Eurasische Viperinae umfassen nach Herrmann & Joger (1997) die Gattungen *Vipera*, *Macrovipera*, *Montivipera*, *Daboia*, *Eristicophis*, *Pseudocerastes*.

<sup>5</sup> Paläarktische Viperinae umfassen alle Taxa, die zoogeographisch der paläarktischen Fauna zugerechnet werden (*Vipera* s. l., *Macrovipera*, *Montivipera*, *Daboia*, *Eristicophis*, *Pseudocerastes*). Die bikontinental verbreiteten Gattungen *Echis* und *Cerastes* sind zoogeographisch ambivalent.



(z.B. Schwarz 1936, Mertens & Wermuth 1960, Harding & Welch 1980). Die chaotischen und inflationären nomenklatorischen Versuche durch Reuss waren für die Systematik eurasischer Vipern kontraproduktiv (Obst 1982, Krecsák & Bohle 2008). Saint Girons (1978) unterschied noch sehr undifferenziert drei Gruppen „*russelii*“, „*lebetina*“ und „kleine europäische Vipern“, ohne sie näher zu definieren. Erst Obst (1982) unternahm den begründeten Versuch, die morphologisch sehr heterogene Gruppe nomenklatorisch zu unterscheiden. Nach morphologisch-zoogeographischen Kriterien definiert er die Gruppen *berus-ursinii* (*Vipera* – Laurenti 1768) und *aspis-ammodytes-latastei* (*Rhinaspis* – Bonaparte 1834). Alle übrigen eurasischen Viperinae – mit Ausnahme von *Eristicophis*, *Cerastes* und *Echis* – subsumiert er unter dem Sammelbegriff *Daboia* Gray, 1842. Trotz auffallend ökologisch und morphologisch abweichender Merkmale synonymisiert er *Pseudocerastes persicus* (*persica*) Boulenger, 1896 mit *Daboia*. Joger (1984) befürwortet die Abtrennung der großen orientalischen Vipern (*lebetina* und *russelii*) von *Vipera*, lehnt die Einbeziehung des *Montivipera xanthina*-Komplexes und *Pseudocerastes* jedoch zu Recht ab. Im Nachhinein erwies sich der von Obst verwendete Name *Rhinaspis* jedoch als Synonym von *Vipera* und ist daher ungültig (siehe Nilson & Andrén 1997). Die von Obst (1982) vorgeschlagene systematische Gliederung in die *Vipera berus-ursinii*-, *Vipera ammodytes-aspis-latastei*-Gruppe stößt auf breite Zustimmung und wird mit veränderter Nomenklatur von anderen Autoren übernommen. Zerova (1992) führt den Namen *Pelias* Merrem, 1820 für die *berus-ursinii*-Gruppe ein. Joger & Stümpel (2005a) schließen sich dem an. Andere Autoren (z.B. Mallow et al. 2003) splitten die Gruppe noch weiter auf und trennen die *ursinii-renardi*-Gruppe als Untergattung *Acridophaga* Reuss, 1927 von *Pelias* ab.

Stammbaumrekonstruktionen auf Basis morphologischer Daten führten bisher zu keinen konsistenten Hypothesen und sind zumindest teilweise mit molekularen Bäumen im Konflikt (z.B. Saint Girons 1978, Groombridge 1980, Nilson & Andrén 1986a, Marx et al. 1988).

Moderne, molekulare Analysemethoden veränderten den Blickwinkel auf die Stammesgeschichte der Viperinae und erbrachten neue Erkenntnisse. So wurden auf Basis von Blutserum-Analysen die Arten *lebetina* und *mauritanica* in einer eigenen Gattung *Macrovipera* Reuss, 1927 zusammengefasst (Herrmann et al. 1992b). *Vipera* (s.l.) wurde dadurch paraphyletisch (Lenk et al. 2001) und es entstand die Notwendigkeit, die Bergottern nomenklatorisch zu trennen. Nilson et al. führten 1999 den Namen *Montivipera* für die orientalischen Bergottern ein, der später durch Joger (2005) in den Rang einer Gattung erhoben wurde.

Herrmann et al. (1999) und Lenk et al. (2001) rekonstruierten erstmals die Stammesgeschichte der Viperinae auf Grundlage von Gensequenzen. Der Datensatz von Lenk et al. (2001) umfasste nur 16 Taxa (OTUs) repräsentativer eurasischer Vipern,

dennoch bestätigt er die Monophylie von *Vipera*, *Montivipera*, *Macrovipera*, *Daboia* und *Eristicophis/Pseudocerastes*. Beziehungen zwischen den Kladen sind jedoch nicht statistisch abgesichert. Zudem unterscheidet sich die Position von *Vipera* zwischen den Baumrekonstruktionsverfahren. In einer späteren Untersuchung von Garrigues et al. (2005) verfolgten die Autoren die Absicht, die Verwandtschaftsverhältnisse paläarktischer Viperinae zu rekonstruieren. Ihr Datensatz berücksichtigt nahezu alle repräsentativen Linien, dennoch gelang es den Autoren nicht, robuste Stammbäume zu berechnen – basale Linien sind polytom oder haben geringe statistische Unterstützungen.

Im Mittelpunkt aktueller stammesgeschichtlicher Forschungen standen bisher einzelne Artengruppen. Die Gattung (Untergattung) *Pelias* wurden von Kalyabina-Hauf et al. (2004) und Ursenbacher et al. (2006) untersucht. Später folgten Verwandtschaftshypothesen über die Arten *Vipera aspis* (Ursenbacher et al. 2006, Barbanera 2009) und *Vipera ammodytes* (Ursenbacher et al. 2008). Nahezu unberücksichtigt blieben bisher die Gattungen *Montivipera* und *Macrovipera* sowie der Artkomplex *Vipera latastei*.

Ein ganzheitlicher Versuch, die Diversität eurasischer Vipern mit einem umfassenden Taxonsampling zu erfassen und ihre Phylogenie auf Basis von Sequenzdaten zu rekonstruieren, fehlt bislang. Zudem sind alle publizierten Stammbäume Mitochondrien-Phylogenien, die nur den maternalen Aspekt der Phylogenie abbilden. Diploide Markergene, die aufgrund des mendelischen Erbganges alternative Informationen tragen, wurden in den Untersuchungen von Lenk et al. (2001), Garrigues et al. (2005) und Ursenbacher et al. (2006, 2008) nicht verwendet.

Ziel der Untersuchungen ist es, die umstrittene Systematik der Viperinae auf Basis eines umfassenden Taxon- und Sequenz-Datensatzes zu stabilisieren und folgende Fragen zu beantworten:

- 1) Wie sind die phylogenetischen Beziehungen zwischen *Pelias*, *Vipera*, *Macrovipera*, *Montivipera* und *Daboia*? Sind *Vipera* und *Pelias* die Schwestergruppe von *Daboia*, wie von Wüster et al. (2008) gezeigt?
- 2) Ist *Vipera ammodytes* die Schwesterart aller Arten aus der Gattung *Vipera* wie von Garrigues et al. (2005) vermutet oder nur von *V. latastei* und *V. aspis*?
- 3) Wie sind die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Subgattung *Pelias*? Ist *Vipera anatolica* die Schwesterlinie der *berus*- und *ursinii*-Komplexe?
- 4) Bestätigen diploide Kerngene die Phylogenese maternaler mt-Marker oder zeigen sie alternative Hypothesen auf?

## 5.2 Ergebnisse

### 5.2.1 Sequenz- und Sättigungsanalyse

Der konkatenierte Datensatz mit je zwei Kern- und Mitochondriengenomen umfasst 5434 Alignmentpositionen mit 71 OTUs und 69 Haplotypen. Die Analyse unter dem MP-Kriterium ergab 892 Parsimonie-informative und 283 uninformative Merkmale. Davon entfallen 156 Parsimonie-informative und 178 Parsimonie-uninformative Merkmale auf die beiden Kerngene Rag1 und Bach1. Folgende empirische Basenfrequenzen wurden für Kerngene: A = 0,33, C = 0,19, G = 0,21, T = 0,26 und mt-Gene: A = 0,28, C = 0,3, G = 0,14, T = 0,29 ermittelt.

Die unkorrigierten p-Distanzen sind in den Kerngenen erwartungsgemäß um ein Mehrfaches niedriger als in den Mitochondriengenomen (Tabelle 14). Die Divergenz innerhalb eurasischer Viperinae beträgt für die Gene Rag1 3,14% und 3,6% für Bach1. Innerhalb der Subkladen ist die Divergenz deutlich geringer, wobei die p-Distanzen bei Bach1 gegenüber Rag1 um den Faktor 2 erhöht sind. Die Distanzen der mt-Gene COI und Cytb unterscheiden sich nicht signifikant (U-Test,  $p < 0,05$ ), sind aber bei Cytb tendenziell höher und betragen für eurasische Vipern maximal 22%.

Tabelle 14: Maximale unkorrigierte genetische Distanzen (p-Distanz) für ausgewählte Kladen der Datensätze 1920 und 3514.

Klade	Rag1	Bach1	COI	Cytb
<i>Macrovipera</i>	0,0004	0,0018	0,0636	0,0959
<i>Montivipera</i>	0,0021	0,0064	0,0923	0,0921
<i>Daboia</i>	0,0050	0,0101	0,1396	0,1569
<i>Vipera</i>	0,0079	0,0147	0,1447	0,1443
eurasische Viperinae	0,0314	0,0360	0,2090	0,2184

Sättigungseffekte wurden für die untersuchten Gene und Codon-Positionen getrennt untersucht. Abbildung 16 zeigt das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen, aufgetragen gegen die korrigierte genetische Jukes-Cantor-Distanz. Die Sequenzen von Cytb und COI zeigen unter dem Jukes-Cantor-Modell zur Distanzkorrektur in keiner Codon-Position Sättigungseffekte. Wenngleich das schneller evolvierende Gen Cytb in der dritten Codon-Position Tendenzen zu Mehrfachsubstitutionen aufweist.

Die graphischen Ergebnisse der Sättigungsanalyse werden auch von dem „Information entropy-based-Index“ bestätigt. Für die untersuchten Kerngene wurden keine Sättigungseffekte festgestellt. In allen Codon-Positionen ist der  $I_{ss}$  sowohl für symmetrische als auch asymmetrische Topologien signifikant kleiner als der  $I_{ss,c}$  (für 4, 8, 16, 32 OTUs).

Gleiches gilt für die ersten beiden Codon-Positionen der mitochondrialen Gene ( $I_{ss} < I_{ss.c}$ ,  $p < 0,001$ , für 4, 8, 16, 32 OTUs). Etwas undeutlicher sind die Ergebnisse des „Information-entropy-based Index“ für die dritte Codon-Position der mt-Gene (nur für das Subset 16 OTUs). Der resultierende  $I_{ss}$ -Wert für symmetrische Topologien ist bei dem Gen COI signifikant kleiner als der  $I_{ss.c}$  und marginal größer für asymmetrische Topologien ( $I_{ss} = 0,477$ ,  $I_{ss.asym} = 0,428$ ,  $p = 0,6689$ ). Ähnlich ist die Tendenz für das Gen Cytb. Auch hier ist in der dritten Codon-Position des Subsets 16 OTUs der  $I_{ss}$ -Wert für symmetrische Topologien signifikant kleiner als der  $I_{ss.c}$  und marginal größer für asymmetrische Topologien ( $I_{ss} = 0,490$ ,  $I_{ss.asym} = 0,489$ ,  $p = 0,0301$ ). Das bedeutet, dass die dritte Codon-Position der mt-Gene Cytb und COI auch für das Subset 16 OTUs ein brauchbares Signal liefert, wenn die Phylogenie nicht stark asymmetrisch ist. Die dritte Codon-Position wurde daher von den phylogenetischen Analysen nicht ausgeschlossen.

Mit dem Programm MrModeltest wurden drei verschiedene Modelle zur Sequenzevolution ermittelt. Demnach sind die geeignetsten Modelle zur Distanzkorrektur HKY+I+G (Rag1), GTR+I (Bach1) und GTR+I+G für die mt-Gene.

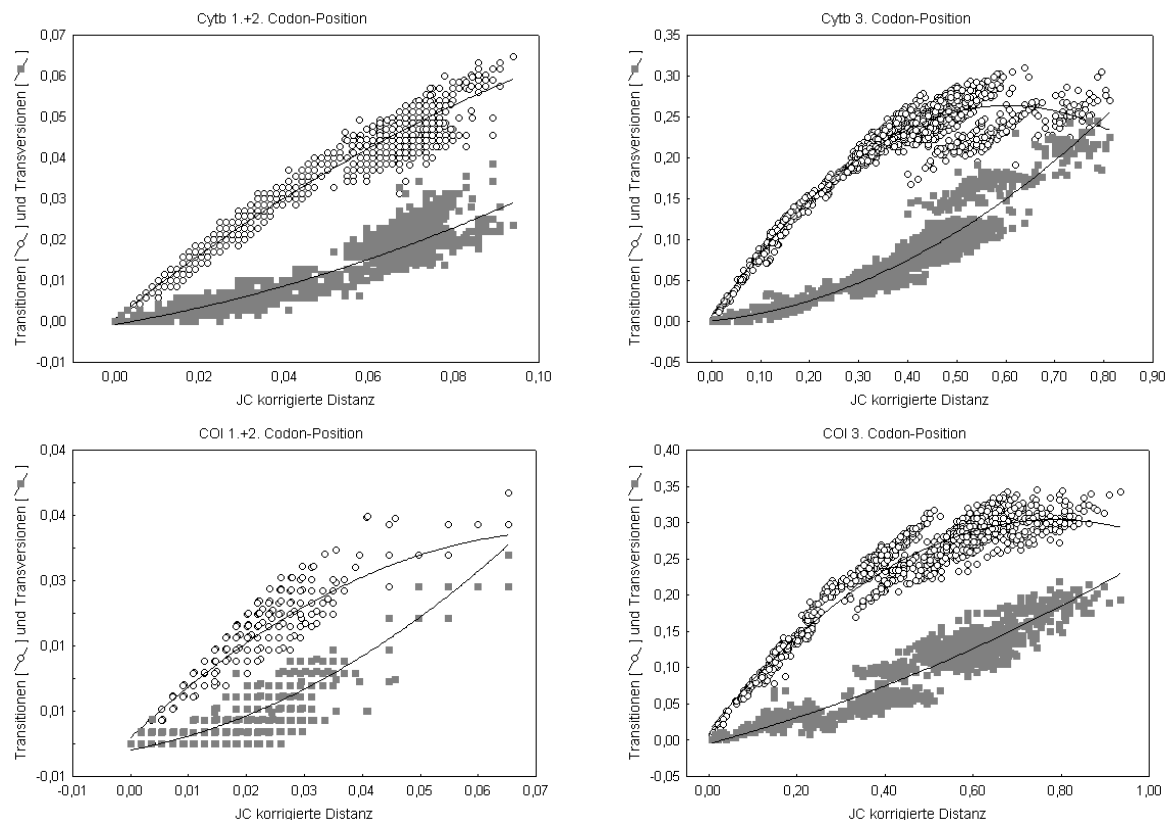


Abbildung 16: Graphische Sättigungsanalyse generiert mit DAMBE (Xia & Xie 2001) für die untersuchten mt-Gene Cytb und COI, des Datensatzes 1920. Anzahl beobachteter Transitionen (Ts) und Transversionen (Tv) sind gegen die korrigierte genetische Jukes-Cantor (JC) Distanz der paarweise verglichenen Sequenzen aufgetragen (weitere Erläuterungen siehe Abbildung 5). Die dritte Codon-Position zeigt in beiden Genen Tendenzen zur Sättigung.

### 5.2.2 Phylogenie auf Basis konkatenierter Mitochondrien- und Kerngene

Die Rekonstruktion der Phylogenen mit Bayesian Inferenz (Abbildung 17), Maximum Likelihood (Abbildung 18) und Maximum Parsimony (Abbildung 19) erzeugt vollständig aufgelöste, dichotom verzweigte Topologien mit hohen Posterior-Probability- und Bootstrap-Werten. Die Topologien zeigen ein hohes Maß an Kongruenz, ohne jedoch absolut deckungsgleich zu sein. Die Unterschiede zwischen den Topologien werden im Kapitel 5.2.4 „Kongruenztest“ näher beleuchtet.

Die bayesianische Inferenz-Topologie zeigt mehrere distinkte Kladen. Die in Afrika, Arabien und dem Orient verbreiteten Gattungen *Echis* und *Cerastes* bilden eine Klade, die den Arten eurasischer Herkunft gegenüber stehen. Eine basale Position im Baum nehmen auch *Pseudocerastes* und *Eristicophis* ein, die auf Wüsten und Halbwüsten des Nahen Ostens (einschließlich Pakistan) beschränkt sind. Hohe genetische und taxonomische Diversität zeigt sich in der Schwestergruppe von *Pseudocerastes* und *Eristicophis*. Die Innengruppe besteht aus zwei Schwestergruppen (orientalische Vipern und europäische Vipern) mit nahezu symmetrischer Topologie und ähnlicher Anzahl von Arten. Innerhalb *Vipera* nimmt die Hornotter eine basale Stellung ein und clustert nicht mit *aspis* und *latastei*. *Vipera* (s.str.) ist demnach eine paraphyletische Gruppe, während *Pelias* monophyletisch ist. Balkanhornottern (*ammodytes*) sind in dem Datensatz nicht mit allen nominellen Taxa vertreten, weisen aber dennoch eine hohe genetische Diversität auf. Proben aus Montenegro und der Insel Krk sind paraphyletisch und gehen nicht auf den gleichen Vorfahren zurück (va10, va9, va6).

Die genetischen Analysen zeigen *Vipera aspis* und *latastei* als Schwesterarten. *Vipera latastei gaditana*, die beiderseits der Straße von Gibraltar verbreitet ist, gruppiert sich mit der iberischen *V. l. latastei* und nicht mit *V. monticola* aus Afrika.

In der Untergattung *Pelias* bildet die nordeurasisch verbreitete *berus*-Gruppe mit den evolutionär jungen Linien *nikolskii*, *berus* und *bosniensis* einen Zweig, an dessen Basis die in Iberien reliktiert verbreitete *V. seoanei* steht. Die Wiesen- und Steppenottern – auch unter dem Untergattungsnamen *Acridophaga* geführt – sind monophyletisch und bilden zusammen mit den türkischen Arten *kaznakovi (ornata)* und *anatolica* die Schwesterklade zur *berus*-Gruppe. Die Position der Arten *V. kaznakovi* und *V. anatolica* an der Basis zu *V. ursinii* und *V. renardi* ist überraschend, aber durch hohe Posterior-Probabilities gestützt.

Ebenso überraschend ist die Stellung der kaukasischen *V. orlovi* zusammen in einem Zweig mit *V. ursinii*. Wiesenottern aus Bosnien-Herzegowina und Montenegro, die taxonomisch

einheitlich als *V. macrops* eingestuft werden, gehören unterschiedlichen Linien an. *Vipera ebneri* ist genetisch zu *V. renardi* gestellt.

Den verhältnismäßig kleinen Arten der Gattung *Vipera* stehen die großwüchsigen Gattungen des Nahen Ostens, Nordafrikas und Asiens gegenüber, die monophyletisch sind. Ein evolutionär alter Zweig ist *Daboia* mit den tief abzweigenden Linien *russellii*, *palaestinae* und *mauritanica*, die ein disjunktes Verbreitungsareal vom Atlantik bis zum südchinesischen Meer und der Bali-See bewohnen. Die Levanteottern (*Macrovipera*) des Vorderen Orients und Mittelasiens bilden sieben deutlich distinkte Kladen. Rezente Vertreter einer ursprünglichen, bislang unbekannten Linie, wurden im Rahmen der Arbeit im Südiran entdeckt. Die wenigen bekannten Exemplare sind morphologisch und ökologisch von *Macrovipera lebetina* deutlich verschieden. Innerhalb der Art *M. lebetina* stimmen die evolutionären Linien weitgehend mit den beschriebenen Subspezies überein. Die mediterranen Inselformen bilden die Ausnahme. Haplotypen von der Insel Zypern, dem Kykladen-Archipel und der türkischen Südküste (Mersin) haben einen gemeinsamen Vorfahren aus jüngerer geologischer Zeit.

Die Schwestergruppe von *Macrovipera* ist *Montivipera*. Der Zweig ist stark asymmetrisch. Die *raddei*-Gruppe (Kurdistan, Iran, Armenien, Aserbaidschan) ist das östliche Pendant zur *xanthina*-Gruppe (Anatolien, Kurdistan, Levante). Sie zeigt in den untersuchten Genen eine vergleichsweise geringe Variabilität.

Während die *xanthina*-Gruppe in der mt-Phylogenie monophyletisch ist, wird sie in dem kombinierten Datensatz aus haploiden und diploiden Genen als paraphyletische Gruppe abgebildet. Die verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der *xanthina*-Gruppe und zwischen *xanthina*- und der *bornmuelleri*-Gruppe können nicht eindeutig geklärt werden. Die phylogenetischen Signale zwischen mt-Genen und Kerngenen sind widersprüchlich. Das zeigt sich auch an dem geringen Posterior Probability Wert (0,73) innerhalb der nominellen *xanthina*-Gruppe.

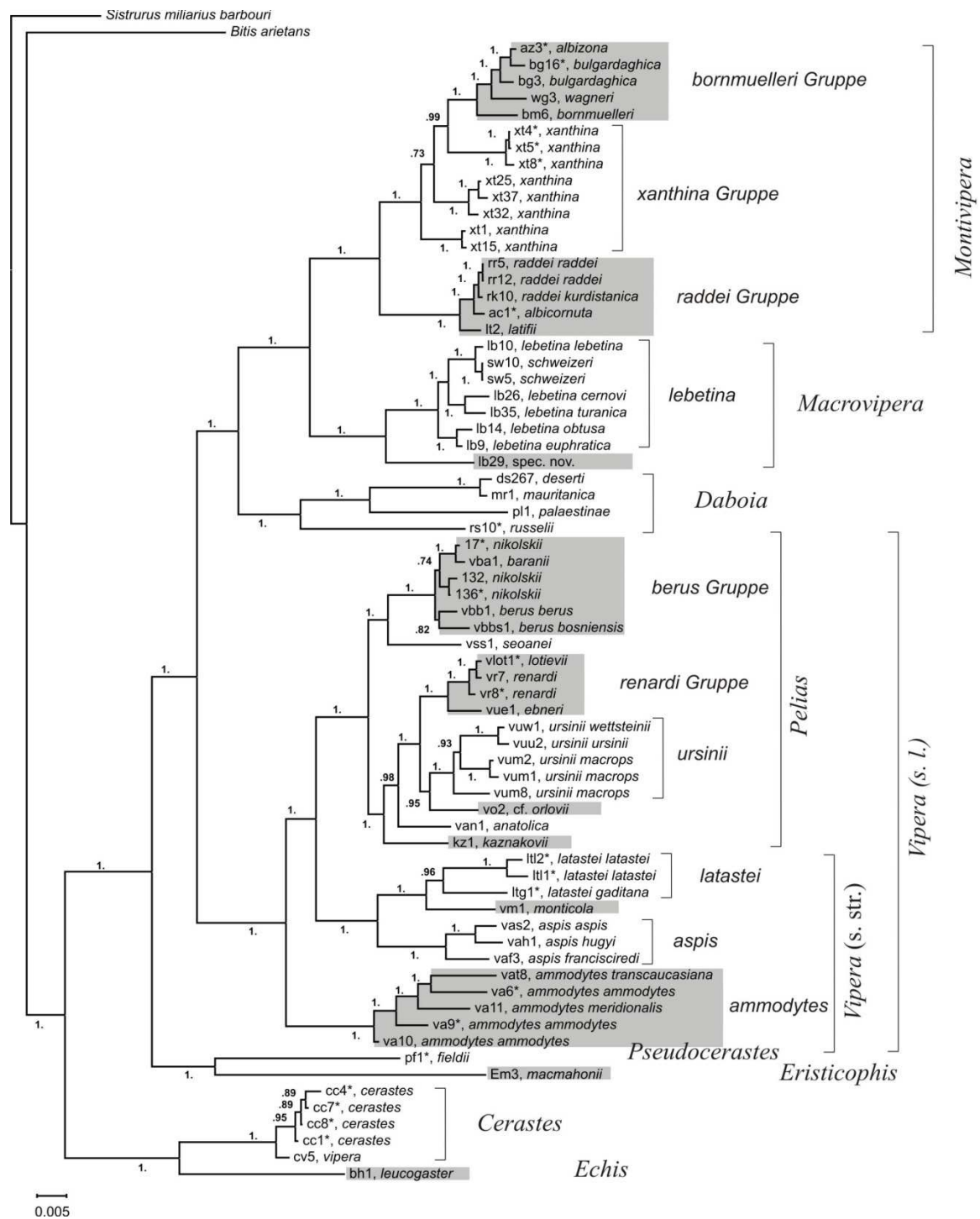


Abbildung 17: 50%-majority-rule-consensus Phylogramm eurasischer Viperinae, mit Angabe der Posterior Probabilities. Für die bayesianische Analyse wurden zwei Kerngene (Rag1, Bach1; Datensatz 3514) sowie zwei Mitochondriengene (Cytb, COI; Datenstz 1920) zu einem Supergen mit 5434 Alignmentpositionen verkettet. Der Datensatz wurde für die Analyse in MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003) in drei Teile mit separaten Evolutionsmodellen partitioniert (Rag1: HKY+I+G, Bach1: GTR+I, mt-Gene: GTR+I+G). Zwei simultane MC3-Analysen mit je vier Ketten sammelten über 5 Mio. Generationen jeden 200sten Baum. Die ersten 25% wurden als Burnin verworfen und für die Berechnung des Konsensusbaumes nur Generationen der stabilen Phase herangezogen. Neben den in MrBayes implementierten Diagnosemöglichkeiten wurde die Konvergenz der Ketten zusätzlich mit dem Programm Tracer (Rambaut & Drummont 2007) überprüft.

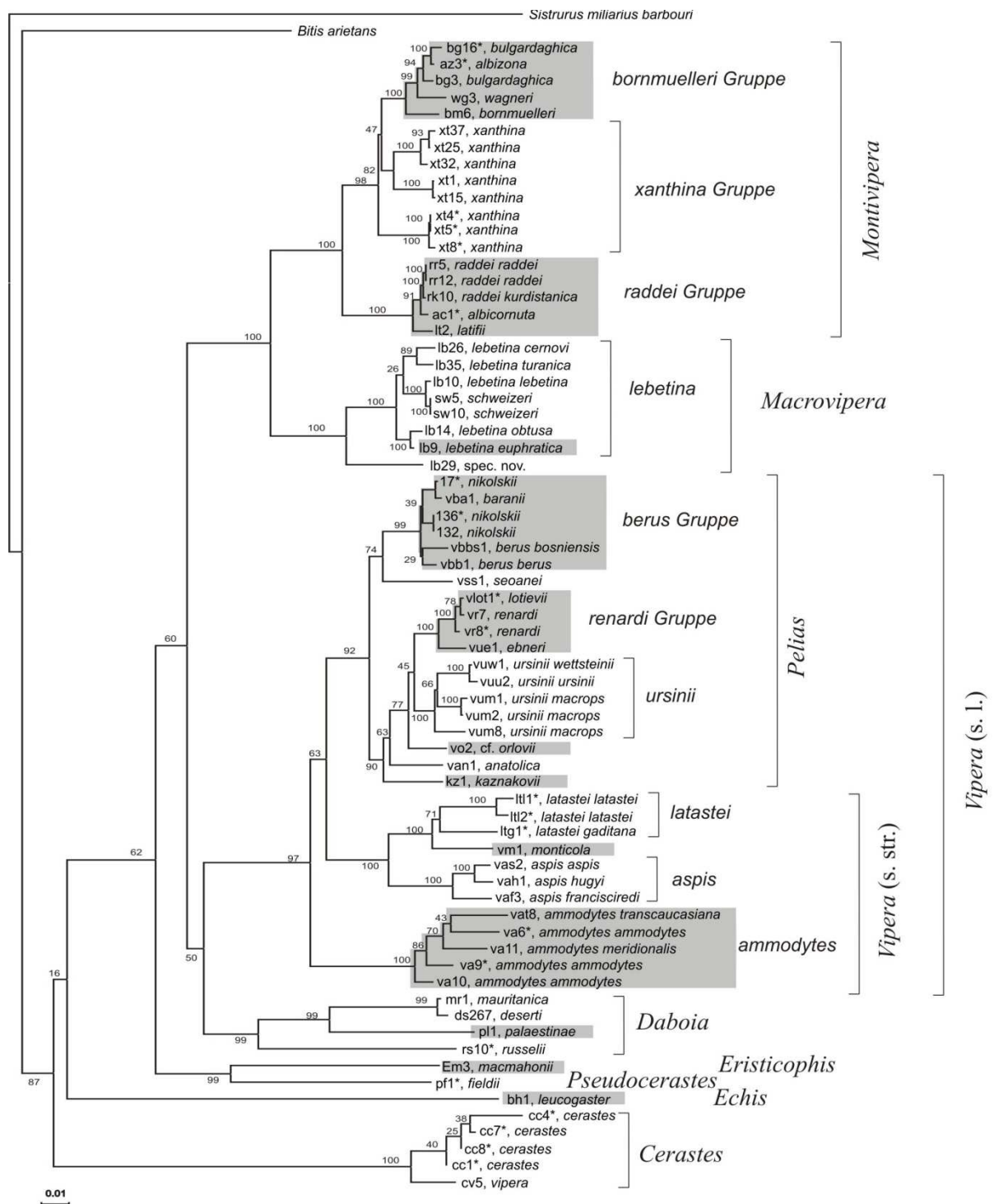


Abbildung 18: Maximum-Likelihood-Phylogramm eurasischer Viperinae (Topologie mit dem höchsten Likelihood,  $\log l_k = -23547.96171$ ), mit Angabe der Bootstrapwerte. Der Baum wurde mit dem Programm PHYML (Guindon & Gascuel 2003) unter Verwendung des GTR+I+G Modells und 100 Bootstrap-Wiederholungen ermittelt. Für die Berechnung wurden zwei Kerngene (Rag1, Bach1; Datensatz 3514) sowie zwei Mitochondriengene (Cytb, COI; Datensatz 1920) zu einem Supergen mit 5434 Alignmentpositionen konkateniert.



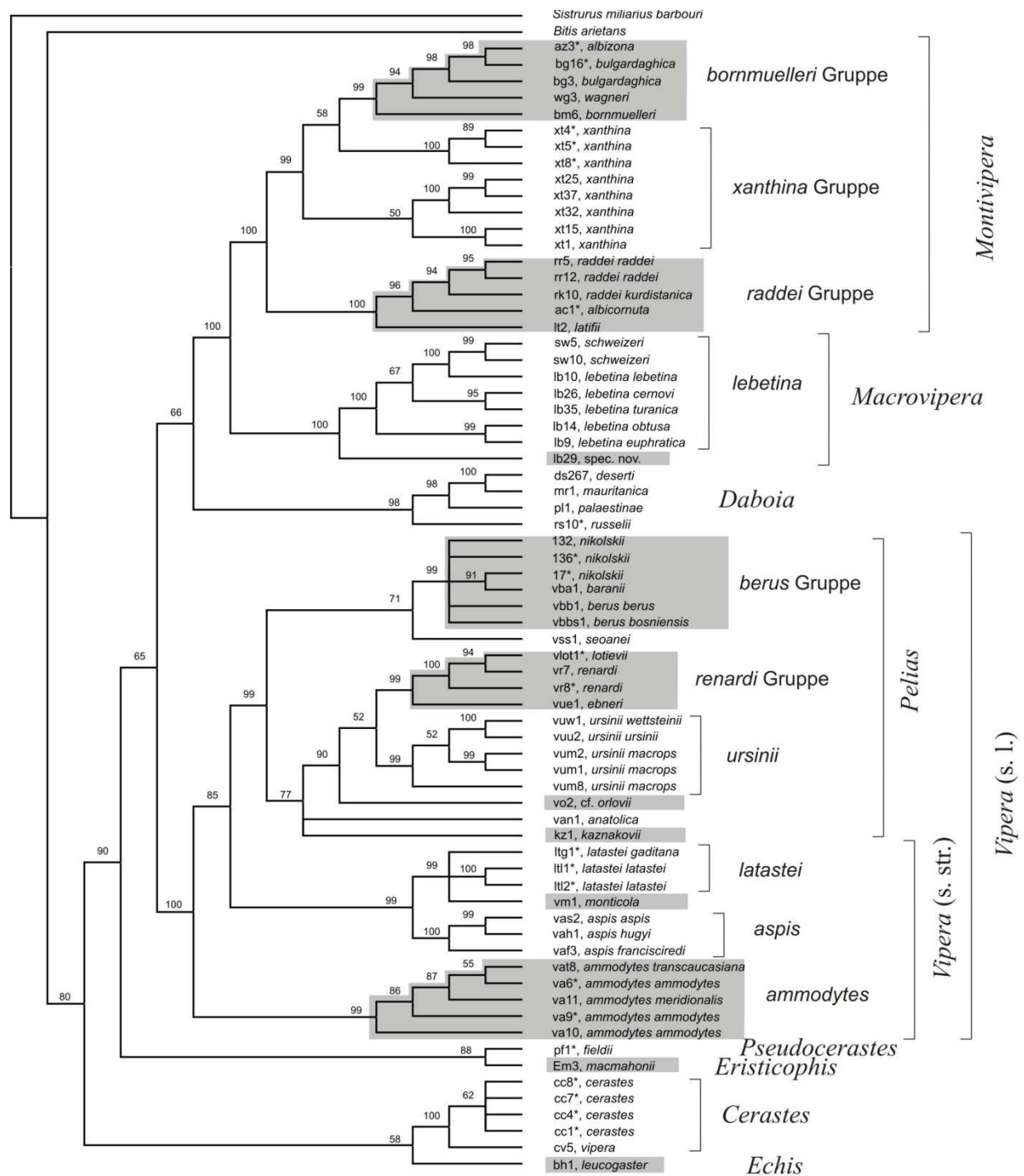


Abbildung 19: 50%-majority-rule-consensus-Phylogramm eurasischer Viperinae der kombinierten mt-nc-Datensätze 1920 und 3514, mit Angabe der Bootstrapwerte. Die Maximum-Parsimony-Analyse wurde mit heuristischem Baumsuchverfahren (TBR branch swapping) und 100 random-additions in PAUP\*4.0b10 (Swofford 2001) durchgeführt. Die Verlässlichkeit der Knoten wurde über 1000 Bootstrap-Wiederholungen mit je 10 „Random-taxon-additions“ pro Replikat ermittelt.

## 5.2.3 Phylogenie auf Basis von Kerngenen

### 5.2.3.1 Sequenz- und Sättigungsanalyse

Das konkatenierte Alignment der diploiden Kerngene Rag1 und Bach1 umfasst 71 OTUs mit 3514 Charakteren und 46 Haplotypen. Davon sind 156 Positionen Parsimonie-informativ. Weitere 174 variable Positionen sind Parsimonie-uninformativ.

Die Nukleotidsequenzen der "Großvipern" (*Bitis*, *Daboia*, *Montivipera*, *Macrovipera*, *Pseudocerastes*) und *Sistrurus* sind gegenüber denen der Gattung *Vipera* (s. l.) durch eine Leucin- und Thryptophan-codierende Insertion um sechs Basen verlängert.

Die Elektropherogramme der Kerngene Rag1 und Bach1 liegen teilweise als Allelvarianten vor. Ihr Anteil ist in beiden Genen ungleich. Die Sequenzen des Locus Rag1 waren zu 37,8% heterozygot (n=74), die des Gens Bach1 hingegen nur zu einem Anteil von 26% (n=77). Die Allelvarianten unterscheiden sich durch Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single

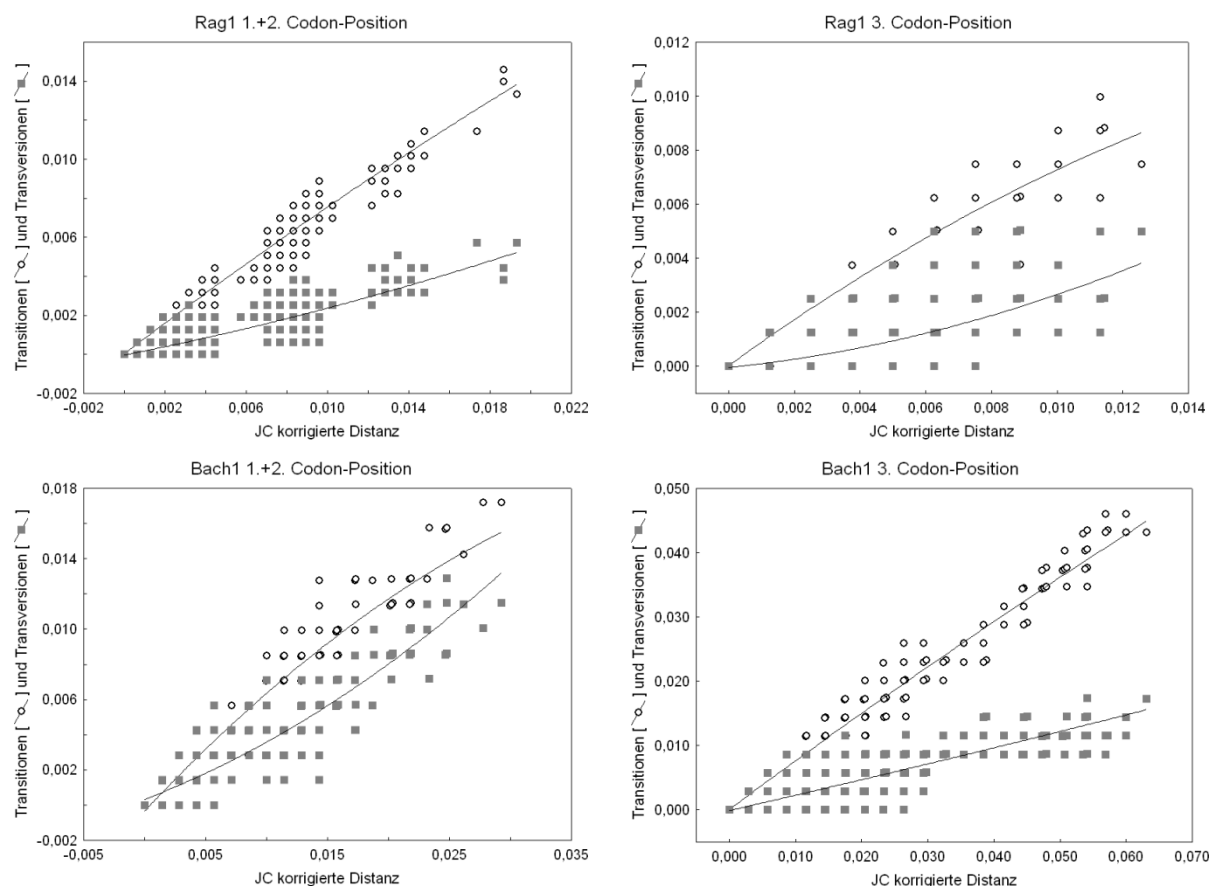


Abbildung 20: Graphische Sättigungsanalyse generiert mit DAMBE (Xia & Xie 2001) für die untersuchten Kerngene Rag1 und Bach1, des Datensatzes 3514. Anzahl beobachteter Transitionen (Ts) und Transversionen (Tv) sind gegen die korrigierte genetische Jukes-Cantor (JC) Distanz der paarweise verglichenen Sequenzen aufgetragen. Tendenzen zur Sättigung sind nicht erkennbar.

Nucleotide Polymorphism, SNPs), die ungleichmäßig häufig auftreten. Ihr Anteil liegt in beiden Loci (Rag1, Bach1) deutlich unter 1% und kann zwischen den Proben der gleichen Art stark verschieden sein. Die höchste Anzahl heterozygoter Sequenzpositionen wurde bei *Vipera aspis francisciredi* (Vaf3) im Gen Bach1 mit sieben SNPs auf 1096 bp festgestellt (= 0,64%).

Sättigungseffekte wurden für die untersuchten Gene und Codon-Positionen getrennt untersucht. Abbildung 20 zeigt das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen, aufgetragen gegen die korrigierte genetische Jukes-Cantor-Distanz. Die Sequenzen von Rag1 und Bach1 zeigen unter dem Jukes-Cantor-Modell zur Distanzkorrektur in keiner Codon-Position Sättigungseffekte.

### 5.2.3.2 Bayesian Inferenz

Die Rekonstruktion der Phylogenese mithilfe der diploiden Kerngene liefert eine alternative Topologie zur mt-Phylogenie. Der BI-50%-Majority-rule-consensus-Baum zeigt alle taxonomischen Gruppen als distinkte Kladen (Abbildung 21). Stammlinienvertreter von *Vipera* (s. l.), *Montivipera*, *Macrovipera*, *Pseudocerastes* und *Daboia* sind simultane Abzweigungen eines Knotens. Weitere Polytomien gibt es in der Kronengruppe. OTUs aus der *raddei*-, *bornmuelleri*-, *xanthina*- und *lebetina*-Gruppe sind mehrfach verzweigt. Die weichen Polytomien lassen sich in dem BI-Baum nur durch das Hinzufügen kompatibler Gruppen auflösen. Entsprechend niedrig sind ihre Posterior-Probabilities.

Die mit *Sistrurus miliarius barbouri* gewurzelte Innengruppe hat ein anderes Verzweigungsmuster als die mt-Phylogenie. Konkordant zu dem Datensatz 5434 bilden die Gattungen *Echis* und *Cerastes* eine basale, robust gestützte Gruppe. *Daboia* hat einen polyphyletischen Ursprung. *Daboia mauritanica*, *D. deserti* und *D. palaestinae* clustern ohne *D. russelii*.

*Macrovipera* und *Montivipera* sind monophyletische Gruppen mit maximalen Posterior-Probabilities. Haplotypen der Subspezies von *Macrovipera lebetina* bilden keine geographischen Gruppen. *Macrovipera*-Proben aus dem Südiran sind eine separate Linie, die signifikant von *M. lebetina* verschieden ist.

Innerhalb der Bergottern (*Montivipera*) sind, übereinstimmend mit der taxonomischen Klassifizierung, *raddei* (s.l.) und *bornmuelleri* (s.l.) genetisch distinkte Kladen. *M. xanthina* hat ein ungeklärtes, polytomes Verzweigungsmuster.

Die heterozygote Sequenz des F1-Gefangenschafts-Hybriden (hybrid 34) zwischen den Arten *M. raddei* (1,0) und *M. xanthina* (0,1) ist in einer variablen Sequenzposition homozygot und identisch mit der Paternalsequenz. Daher nimmt die Probe eine gesonderte Position im Stammbaum basal zu *M. xanthina* ein.

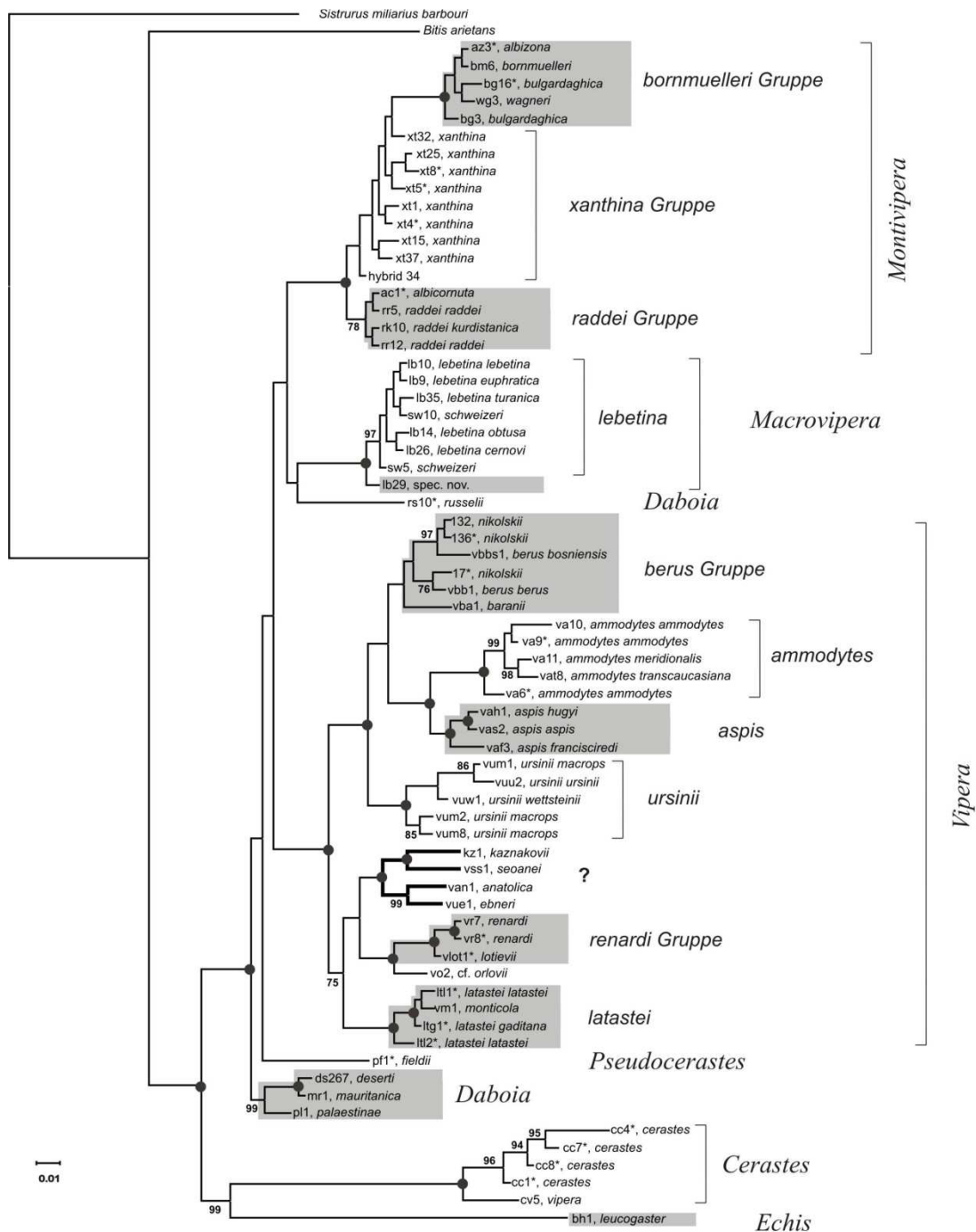


Abbildung 21: 50%-majority-rule-consensus-Phylogramm eurasischer Viperinae (Datensatz 3514). Zwei Kerngene (Rag1, Bach1) wurden zu einem Alignment mit 3514 Positionen verkettet und mit separaten Evolutionsmodellen (Rag1: HKY+I+G, Bach1: GTR+I) in MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003) analysiert. Polytomien wurden durch das Hinzufügen kompatibler Gruppen mit dem Befehl „Allcompat“ aufgelöst. Zwei simultane MC<sup>3</sup>-Analysen mit je vier Ketten sammelten über 10 Mio. Generationen jeden 200sten Baum. Die ersten 25% wurden als Burnin verworfen und für die Berechnung des Konsensusbaumes nur Generationen der stabilen Phase herangezogen. Neben den in MrBayes implementierten Diagnosemöglichkeiten wurde die Konvergenz der Ketten zusätzlich mit dem Programm Tracer (Rambaut & Drummond 2007) überprüft. Angegeben sind nur Posterior-Probabilities  $\geq 0,75$ . Schwarze Kreise symbolisieren Werte von 1,0.

Die kleinen europäischen Viperiden bilden sieben distinkte Kladen mit zuverlässigen Posterior-Probabilities. Die Balkanhornotter *Vipera ammodytes* ist die Schwesterart der Aspispiper (*V. aspis*). Die Relation ist kontradiktorisch zu der Topologie des Datensatzes 5434. Hier ist die Aspispiper die Schwesterart von *V. latastei* und die Hornotter steht basal allen anderen Vertretern der Gattung *Vipera* gegenüber. Wider Erwarten zeigen die Kronengruppen der Gattung *Vipera* eine deutliche geographische Struktur. Griechische (*meridionalis*) und türkische (*transcaucasiana*) Hornottern haben einen gemeinsamen Ursprung. Nicht so Hornottern aus Montenegro (Skutarisee) und Kroatien (Krk), die taxonomisch der gleichen Subspezies zugerechnet werden. Kreuzotterverwandte Taxa (*Pelias*) sind die Schwestergruppe von *Vipera ammodytes* und *V. aspis*. Die statistische Unterstützung für diese Relation ist jedoch nicht zuverlässig. In der *berus*-Gruppe clustern die im Habitus sehr ähnlichen *Vipera berus bosniensis* und *V. nikolskii*. Probe 17 ist im Morphotyp *V. nikolskii* und im Genotyp *V. berus*. Introgression durch Hybridisierung ist zwischen diesen beiden Arten gut dokumentiert (z.B. Zinenko 2003). *Vipera barani* nimmt in der *berus*-Gruppe eine basale Stellung ein, ist statistisch jedoch nicht abgesichert.

Wiesenottern vom Balkan, aus Italien und Frankreich sind monophyletisch und bilden mit *ursinii* (s.l.) und *macrops* zwei Haplogruppen.

Die Topologie innerhalb des *ursinii*-, *berus*-, *ammodytes/aspis*-Subzweiges lässt alternative Verzweigungsmuster zu. 75% der Posterior-Probability-Bäume bilden mit *V. latastei*, *V. renardi* und einer dritten Gruppe eine taxonomisch nicht existente Klade. Direkte verwandtschaftliche Beziehungen zwischen *V. latastei* und *V. renardi* sind morphologisch und zoogeographisch unwahrscheinlich. Eine offensichtlich heterogene Gruppe ist die dritte Klade des Subzweiges mit den Arten *Vipera kaznakovi*, *V. seoanei*, *V. anatolica* und *V. ebneri*, die ebenfalls keine taxonomisch definierte Gruppe darstellt. Die Sequenzinformation ihrer Kerngene erlaubt kaum alternative Topologien. Ihre Knoten sind durch hohe Posterior-Probabilities abgesichert.

#### 5.2.4 Kongruenztest verschiedener phylogenetischer Methoden

Die resultierenden Topologien aus BI, ML und MP sind in hohem Maße kongruent, obgleich die Positionen einzelner Zweige zwischen verschiedenen Methoden abweichen. Abbildung 22 zeigt den paarweisen Vergleich zwischen 50%-majority-rule-consensus-Bäumen. Die Gegenüberstellung zeigt topologische Inkongruenz zwischen BI-ML- und BI-MP-Bäumen. Zwischen BI und ML zeigen sich drei markante Unterschiede. (1) In der bayesianischen Inferenz ist die lykische *xanthina* zwischen Haplotypen aus dem Taurus und der *bornmuelleri*-Gruppe positioniert, während sie in der ML-Analyse basal zur gesamten Klade steht. (2) In Übereinstimmung mit morphologischen Merkmalen ist *Daboia* in der BI-Analyse

die Schwestergruppe von *Macro-* und *Montivipera*. Nicht so unter ML. Hier ist *Daboia* die Schwestergruppe von *Vipera*. Allerdings ist der Knoten in nur 50% der Bootstrap-Wiederholungen vorhanden. (3) Sandrasselottern (*Echis*) sind in dem ML-Baum die Schwestergruppe aller eurasischer Viperinae einschließlich *Cerastes* (Bootstrap 16%). Die BI-Inferenz gruppiert *Echis* zusammen mit *Cerastes*.

Zwischen BI- und MP-Bäumen ist die Kongruenz höher. Die topologischen Positionen der Zweige sind in nur einer Position verschieden. *Montivipera xanthina* aus der Ägäis nimmt in der BI-Analyse eine basale Stellung ein, während sie im MP-Baum zusammen mit *xanthina*-Haplotypen aus Lykien clustert. Alle weiteren Unterschiede sind durch Polytomien bedingt. Parsimony-informative Merkmale des Datensatzes reichen nicht aus, um die Polytomien der Gruppen *berus*, *Cerastes cerastes*, *latastei* und *Vipera* (s. str.) aufzulösen.

Vergleicht man die Rekonstruktionsmethoden hinsichtlich ihrer statistischen Verlässlichkeit, so fällt die bayesianische Inferenz mit durchgehend hohen Posterior-Probabilities (PP) auf. Die Gesamtheit aller Knoten hat im Mittel einen PP-Wert von 98,28 (Min. 0,73). Die Wahrscheinlichkeit für die gefundene Topologie ist damit sehr hoch. Deutlich geringer sind die Bootstrap-Werte der MP- (89,52) und ML- (83,09) Analysen, insbesondere für die Knoten, deren Äste im Vergleich zu BI variable Positionen einnehmen.

Die teilweise widersprüchlichen Verzweigungsmuster der Rekonstruktionsmethoden BI, ML und MP wurden mithilfe ihrer Likelihood-Werte auf alternative Baumtopologien getestet. Testergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Die „Confidence-sets“ der drei verschiedenen Tree-Puzzle-Analysen sinken in der Richtung SH>KH>ELW und reflektieren die unterschiedliche Stringenz der Tests. Die KH- und SH-Tests konnten für keine der Topologien die Nullhypothese ablehnen. Die „Confidence-sets“, der mit Consel durchgeführten Analysen zeigen ähnliche Trends. Die p-Werte sinken von SH über AU nach KH.

Der Vergleich zeigt, dass die p-Werte derselben Tests zwischen beiden Programmen nur leicht variieren. Die höchsten Likelihoods hat der Bayesian-Inference-Baum.

Im Ergebnis lässt sich hervorheben, dass keine der Topologien bevorzugt wird. ELW- und AU-Test lehnen jedoch die topologische Struktur des MP-Baumes ab, obwohl seine Struktur der des BI-Baumes recht ähnlich ist.

Nachfolgend wurden weitere Tests durchgeführt, um den möglichen Einfluss von Rekombination, lateralem Gentransfer, direkter Selektion oder anderer Phänomene zu klären, die die phylogenetische Geschichte verschleiern.

Die mit dem Programm RDP3 durchgeführten Rekombinationstests RDP, GENECONV, Bootscan, MaxChi und Chimaera erbrachten keine Rekombinationssignale.

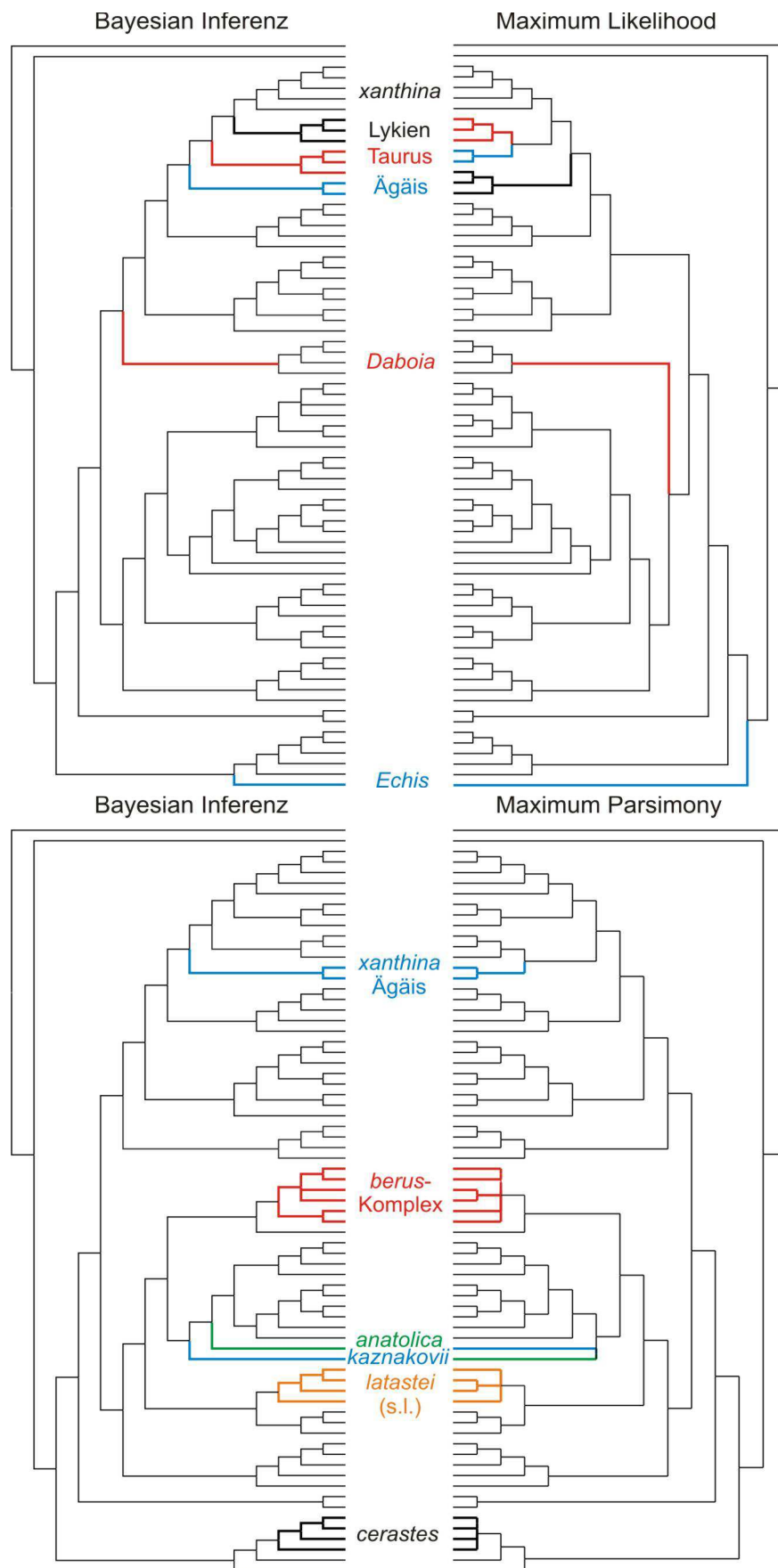


Abbildung 22 (vorherige Seite): Paarweiser Vergleich zwischen 50%-majority-rule-consensus-Bäumen, berechnet mit den Programmen MrBayes (Bayesian Inferenz), PHYML (Maximum Likelihood) und PAUP (Maximum Parsimony). Die Gegenüberstellung zeigt topologische Inkongruenz (farbig markiert) zwischen BI-ML- und BI-MP-Bäumen eurasischer Viperinae (kombinierte Datensätze 1920 und 3514). Die Textfarbe der OTUs korrespondiert mit der Farbe der Zweige.

Tabelle 15: p-Werte für drei Baumalternativen (Tree) der kombinierten Datensätze 1920 und 3514 (ermittelt mit den Programmen Tree-Puzzle und Consel). logL=log-likelihood,  $\delta$ =log-likelihood differences, KH=Kishino-Hasegawa-Test, SH=Shimodaira-Hasegawa-Test, AU=Approximately Unbiased Test, ELW=expected likelihood weights, WKH/WSH=weighted variants of KH/SH Test, +=Nullhypothese kann nicht abgelehnt werden. Nullhypothese N0=kein Unterschied der Topologien (Negation der zu untersuchenden Frage).

Tree	logL	Tree-Puzzle					Consel					WKH	WSH					
		$\delta$	KH	SH	ELW	AU	KH	SH										
MP	-28966,02	25,3	0,063	+	0,071	+	0,003	-	0,017	-	0,054	+	0,081	+	0,054	+	0,098	+
BI	-28940,72	0	1	+	1	+	0,606	+	0,627	+	0,062	+	0,755	+	0,618	+	0,75	+
ML	-28945,93	5,21	0,383	+	0,516	+	0,390	+	0,429	+	0,382	+	0,525	+	0,382	+	0,541	+

### 5.3 Diskussion

Die rekonstruierten Phylogenien des kombinierten Datensatzes 5434 zeigen vollständig aufgelöste, dichotom verzweigte Topologien mit hohen Posterior-Probability- und Bootstrap-Werten. Die berechneten Topologien sind zwischen den Verfahren BI, ML und MP in hohem Maße kongruent. Bedingt durch die unterschiedlichen Algorithmen gibt es jedoch topologische und statistische Diskrepanzen.

Phylogenetische Methoden sollten effizient, leistungsstark, robust und falsifizierbar sein (z.B. Penny et al. 1992, Erixon et al. 2003). Statistische Unterstützungswerte quantifizieren, wie wahrscheinlich eine Klade unter gegebenen Daten und den getroffenen Annahmen korrekt ermittelt wurde (z.B. Page & Holmes 2001). Bekanntermaßen sind die Posterior-Probability-Werte der Bayesian-Inferenz höher als der nichtparametrischer Bootstrap alternativer Baumrekonstruktionsverfahren (z.B. Karol et al. 2001, Erixon et al. 2003). Die Abbildung 17 weist für alle basalen Knoten maximale Posterior-Probabilities auf. In der BI ist die phylogenetische Schwesterbeziehung zwischen *Daboia* und *Macro-*, *Montivipera* zweifelsfrei bewiesen und in Übereinstimmung mit der Maximum-Parsimony-Rekonstruktion und den phylogenetischen Signalen proteincodierender mt-Gene (siehe Kapitel 3). Die von Wüster et al. (2008) vorgeschlagene Schwesterbeziehung zwischen *Vipera* (s.l.) und *Daboia* kann somit nicht bestätigt werden und widerspricht morphologischen Merkmalen zwischen den Gruppen. In den ungewichteten MP- und ML-Stammbäumen von Lenk et al. (2001)



bildet *Daboia* stets die Schwestergruppe von *Macro-* und *Montivipera*. Durch das „Gewichten“ der Sequenzinformation zum Reduzieren von Sättigungseffekten und Homoplasien, wie es Lenk et al. (2001) vorgenommen haben, verändert sich die Topologie. Der gewichtete MP-Baum zeigt *Vipera* (s.str.) als Schwestergruppe von *Macro-* und *Montivipera*, während in der gewichteten ML-Topologie *Vipera* (s. str.) und *Daboia* einen gemeinsamen Vorfahren besitzen. Untersuchungen von Garrigues et al. (2005) bestätigen die Monophylie der orientalischen Vipern. Als unbeständig erweist sich die Position von *Daboia* auch in morphologischen und immunologischen Untersuchungen (Herrmann & Joger 1997).

Eine Überraschung ist die Kladogenese des *Vipera* (s.l.) Subzweiges, die erstmals auf molekularer Basis untersucht wurde. *Vipera* (s.str.) ist wider Erwarten keine monophyletische Gruppe. Die fälschlicherweise aufgrund ihrer Nasenprotuberanz als höher entwickelt eingestufte Arten *Vipera aspis*, *V. latastei* und *V. ammodytes* (z.B. Obst 1982, Brodmann 1987) sind polyphyletisch und gehen auf zwei verschiedene Stammlinien zurück. Das Ergebnis ist in allen Analysen (MP, ML, BI) des Datensatzes 5434 (mt- und Kerngene) konsistent. Die Nasenprotuberanz ist folglich eine konvergente oder parallele Entwicklung und kein Merkmal einer gemeinsamen Abstammung. Bestätigten sich die verwandtschaftlichen Beziehungen, so hätte dies nur nomenklatorische Bedeutung, wenn *Pelias* als eigenständige Gattung aufgefasst würde. *Vipera* (s. str.) Laurenti, 1768 würde in dem Fall paraphyletisch und müsste auf die Arten *aspis* und *latastei* restringiert werden. *Pelias* Merrem, 1820 bliebe für alle Arten ohne Nasenprotuberanz erhalten (siehe auch Joger & Stümpel 2005a).

Innerhalb *Pelias* bestätigt die Topologie im Wesentlichen die Untersuchungen von Kalyabina-Hauf et al. (2004). *Vipera barani* Böhme & Joger, 1983 clustert innerhalb von *V. nikolskii* Vedmederya et al., 1986, sodass *nikolskii* als Synonym von *barani* aufzufassen wäre. Die gemeinsame Stammart bewohnte wahrscheinlich ein zusammenhängendes Areal südlich und östlich des Schwarzen Meeres. Nach molekularen Divergenzzeitberechnungen trennte sich der letzte gemeinsame Vorfahre der türkischen Populationen (*barani*) und der ukrainischen Populationen (*nikolskii*) vor etwa 300.000 Jahren (siehe nächstes Kapitel). Ein Cytb basierter MP-Stammbaum von Joger et al. (1997) zeigt *V. barani* jedoch als Schwesertaxon von *V. b. bosniensis*.

Die Systematik und Taxonomie der Wiesen- und Steppenottern wird kontrovers diskutiert. Zunächst wurde die osteuropäische Steppenotter von Boulenger (1893) sowie Mertens & Müller (1928) als eigene Art (*Vipera renardi*) betrachtet. Schwarz (1936) stufte sie als Unterart von *Vipera ursinii* ein. In der späteren Fassung der „Liste der Amphibien und Reptilien Europas“ revidieren sich Mertens & Müller (1940) und schließen sich der

Auffassung von Schwarz an. Joger et al. (1992) befürworten aufgrund von immunologischen Untersuchungen eine Auftrennung in die fünf Arten *Vipera anatolica*, *V. renardi* (einschließlich *eriwanensis*), *V. ursinii* (einschließlich *wettsteini*), *V. macrops* (einschließlich *graeca* und *rakosiensis*?) und *V. moldavica*. Szczerbak (2003) bleibt konservativ und fasst *V. renardi* weiterhin als Unterart von *V. ursinii* auf.

In ihrer morphologischen Revision des *ursinii-renardi*-Komplexes erkennen Nilson & Andrén (2001) sechs Arten an. Neben *Vipera ursinii* und *V. renardi* akzeptieren sie *anatolica*, *eriwanensis*, *ebneri* und *lotievi* als valide Arten.

In der jüngeren Zeit wurden eine Reihe neuer Morpho-Taxa beschrieben. Steppenottern aus dem Kaukasus wurden in den Rang einer eigenen Art, *Vipera lotievi* gehoben (Nilson et al. 1995). Garanin et al. (2004) beschreiben eine Inselpopulation von *Vipera renardi* in der Wolga als neue Subspezies *bashkirovi*. Eine weitere *renardi*-Population aus der Arealrandlage (Krim) wurde erst jüngst als *Vipera renardi puzanovi* Kukushkin, 2009 von der festländischen Nominatform abgetrennt. Drei weitere Taxa, *Vipera renardi parursinii* Nilson & Andrén, 2001, *V. renardi tienshanica* Nilson & Andrén, 2001 und *Vipera altaica* Tuniyev et al., 2010 wurden aus Zentralasien bekannt.

Obwohl Joger et al. (1992) und Nilson & Andrén (2001) übereinstimmend hervorheben, dass traditionelle morphologische Merkmale nur bedingt geeignet sind, die Spezieskomplexe zu differenzieren, weil sie Ausdruck konvergenter oder reversibler Evolution sind, werden sie dennoch für Artbeschreibungen herangezogen (z.B. Tuniyev et al. 2010).

Während Nilson & Andrén (2001) die Wiesen- und Steppenottern als eigene Untergattung *Acridophaga* abtrennen, lehnen Joger & Stümpel (2005a) dieses Vorgehen ab.

Die *ursinii-renardi*-Artkomplexe wurden molekulargenetisch erstmals von Kalyabina-Hauf et al. (2004) untersucht. Ihre Ergebnisse sind leider nur bedingt interpretierbar, weil alle OTUs mit Ausnahme von *eriwanensis* mit *ursinii* synonymisiert wurden und die Publikation Fundortangaben vermissen lässt. Erst die erneute Diskussion der Ergebnisse durch Joger & Dely (2005) macht den Baum interpretierbar. Danach zeigt die Topologie eine Teilung in eine europäische Art (*ursinii* – Wiesenottern), ihre östliche Schwesterart (*renardi* – Steppenottern) und die basale Art *anatolica*, die nicht mehr zu dem näheren *ursinii-renardi*-Verwandtschaftskreis gerechnet werden kann. Gvoždík et al. (2007) bestätigen die Teilung in zwei genetisch distinkte Kladen (*ursinii* und *renardi*).

Genetisch erstmals untersucht wurde in der vorliegenden Arbeit *V. ebneri*, die erwartungsgemäß (siehe Joger & Dely 2005) mit *V. renardi* clustert.

Meine Ergebnisse zeigen, dass durch Montenegro eine Haplotypengrenze zwischen *V. macrops* und einer weiteren, genetisch deutlich verschiedenen Gruppe verläuft, die vermutlich als *V. u. graeca* identifiziert werden kann.

Neue Einblicke in die Phylogenie des *Acridophaga*-Spezieskomplexes bringen die Sequenzen von *Vipera orlovi*, *V. anatolica* und *V. kaznakovi* mit sich. *Vipera kaznakovi* aus der Türkei (Hopa) steht in der BI- und ML-Analyse an der Basis der Arten *V. renardi*, *V. ursinii*, *V. orlovi* und *V. anatolica*. Die Position von *V. orlovi* ist zwischen den Analysen BI, ML und MP widersprüchlich. Unter bayesianischer Inferenz gruppiert sie mit dem europäischen *ursinii*-Zweig. Biogeographisch scheint die Beziehung unplausibel. Unter Maximum Likelihood und Maximum Parsimony wird eine basale Stellung zu *ursinii* und *renardi* ermittelt. Die phylogenetische Stellung von *orlovi* kann durch kein Baumrekonstruktionsverfahren zweifelsfrei ermittelt werden. In keinem der Baumrekonstruktionsverfahren hat die Klade *orlovi*+Schwestergruppe maximale statistische Unterstützung. Dennoch haben *orlovi* und *kaznakovi* (Hopa-Haplotyp), entgegen den Annahmen von Joger & Stümpel (2005b, S. 79), keinen unmittelbar gemeinsamen Vorfahren, während kaukasische *kaznakovi*-Haplotypen und *orlovi* auf eine Stammlinie zurückgehen (Kalyabina-Hauf et al. 2004).

In den BI- und ML-Stammbäumen nimmt *anatolica* die gleiche Position wie in den Untersuchungen von Kalyabina-Hauf et al. (2004) ein. Den kombinierten mt-nc-Stammbäumen zu Folge ist *anatolica* ein unmittelbarer Nachfahre der *Acridophaga* Stammart. Nach der Beschreibung durch Eiselt & Baran (1970) wurde die Population der seltenen Viper noch bis Anfang der 1980er Jahre als Subspezies von *Vipera ursinii* eingestuft (Joger 1984) und erst später in den Rang einer validen Art gehoben (siehe oben).

Die Phylogenie der orientalischen Viperngattungen *Macrovipera* und *Montivipera* wurde bisher nur sehr marginal untersucht. Sequenzstammbäume wurden erstmal von Lenk et al. (2001) und Wüster et al. (2008) vorgestellt. In den Untersuchungen der Autoren sind die Gattungen jedoch nur durch wenige repräsentative Linien vertreten.

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Lenk et al. (2001) und Wüster et al. (2008) unterstützt der untersuchte Datensatz die Schwesterbeziehung der beiden Gattungen *Macro*- und *Montivipera*, die auch unter morphologischen Gesichtspunkten plausibel ist. Serumalbuminvergleiche stützen diese Hypothese jedoch nicht (Herrmann & Joger 1997).

In den vorliegenden Untersuchungen unterscheidet sich die Kladogenese innerhalb *Montivipera* zwischen den Baumrekonstruktionsverfahren und zwischen Organellen- und Chromosomengenom.

Im Unterschied zum Organellengenom deckt die Sequenzinformation der Kerngene eine Paraphylie von *Montivipera xanthina* (s.l.) auf, die auch im kombinierten Datensatz zum Ausdruck kommt. Die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den *xanthina*-Haplotypen Ägäis, Lykien und Taurus sind jedoch zwischen BI, ML und MP unbeständig. So nehmen Haplotypen aus Lykien entweder eine basale Stellung ein (ML) oder finden sich als abgeleitete Gruppe (BI) in dem Baum wieder. *Montivipera xanthina* wurde bisher als monophyletische Art betrachtet (z.B. Nilson & Andrén 1986a). Morphologische Clusteranalysen von Nilson & Andrén (1986a) zufolge zeigen Populationen von *Montivipera xanthina* eine starke phänetische Struktur mit mehreren distinkten Linien, die durch geographische Vikarianz bedingt ist. Die Autoren schlussfolgern aufgrund der Inkongruenz zwischen den geschlechtsspezifischen Analysen auf erhebliche intraspezifische Variabilität. Sie teilen *M. xanthina* in eine nördliche und eine südliche Form und plädieren dafür, die Morphen taxonomisch unterhalb des Subspezieslevels einzustufen. Tatsächlich zeigen die Clusteranalysen jedoch mindestens eine Dreigliederung, die teilweise durch die genetischen Daten gestützt wird. Genetisch ist *M. xanthina* mindestens ebenso stark differenziert, wie die *bornmuelleri*-Artengruppe (*bornmuelleri*, *wagneri*, *bulgardaghica*, *albizona*). Die genetische Struktur deutet auf eine verkannte taxonomische Diversität hin (Stümpel & Joger 2009). Um die Spezieskomplexe *bornmuelleri*, *xanthina* und *raddei* rankt sich eine erbittert geführte Diskussion zwischen Schätti et al. (1991, 1992) und Nilson & Andrén (1992). Streitpunkte sind kontroverse Interpretationen von Artkonzepten und taxonomische Auffassungen, die kaum gegensätzlicher sein können. Während Nilson & Andrén morphologisch diagnostizierbare Gruppen als Arten abtrennen, fassen Schätti et al. dieselben Gruppen als Polymorphismen ein und derselben Art auf. Auch wenn Artkonzepte und Arten als Kategorien unterschiedlich bewertet werden, muss die Auffassung von Schätti et al. (1991, 1992) klar abgelehnt werden. Polymorphismen setzen per Definition immer mehrere (Gen)-Varianten innerhalb einer Population voraus, die auch im Phänotyp auffindbar sein sollten. Morphologisch sind die nominellen Taxa sicher unterscheidbar (Mulder 1994) und ihre mt-Sequenz-Varianten sind seit mehreren Millionen Jahren genetisch voneinander isoliert (siehe Kapitel 6). Der phänotypische Polymorphismus bei *bulgardaghica* geht auf genetische Introgression oder unvollständiges „Lineage-sorting“ zurück (siehe Kapitel 7).

Während die Gensequenzen der *bornmuelleri*-Gruppe in allen Baumrekonstruktionsverfahren zweifelsfrei auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen, haben die phyletischen Linien von *Montivipera xanthina* keinen unmittelbar gemeinsamen Ursprung und sind paraphyletisch. Die Beziehungen zwischen den Linien kann nicht mit statistischer Sicherheit aufgelöst werden. Nach kladistischen Untersuchungen von Nilson & Andrén

(1986a) gehen *M. xanthina* (s.l.) und die *bornmuelleri*-Gruppe nicht auf einen unmittelbar gemeinsamen Vorfahren zurück. Dahingegen ist die Monophylie der *raddei*-Speziesgruppe in Übereinstimmung mit den morphologischen Untersuchungen von Nilson & Andrén (1986a). Alle Spezies der *raddei*-Gruppe sind durch gemeinsame Merkmale, wie der geschlossene Circumokularring, geeint.

Systematisch und biogeographisch unzureichend untersucht sind die Levanteottern (*Macrovipera*). Ihre Chorologie ist bemerkenswert und für eurasische Viperiden einmalig. Neben dem Hauptverbreitungsgebiet in Asien und dem Vorderen Orient (z.B. Joger 1984) existieren extraterritoriale Vorkommen, die als Exlaven, losgelöst vom zusammenhängenden Areal, isolierte Populationen aufweisen (z.B. Nilson & Andrén 1988). *Macrovipera lebetina lebetina* bewohnt die Insel Zypern, *Macrovipera lebetina schweizeri* wurde als Endemit von den Kykladen beschrieben und *M. lebetina transmediterranea* ist in Nordafrika fernab vom übrigen asiatischen Areal vollkommen isoliert. Bisher wurden acht Taxa aus der Gattung beschrieben, die jedoch zeitweise nicht anerkannt wurden und als Synonyme von *Macrovipera lebetina obtusa* galten (siehe Joger 1984). Eine angekündigte morphologische Revision der Gruppe durch Billing et al. (1984) blieb bisher aus. Die Haplotypen der Gensequenzen segregieren in vier bis fünf Haplogruppen (Stümpel & Joger 2009), die mit Ausnahme von *M. l. schweizeri* die Eigenständigkeit der Taxa *lebetina*, *obtusa*, *euphratica*, *turanica* und *cernovi* bestätigen. Proben von *M. l. transmediterranea* waren nicht verfügbar. Die verwandtschaftlichen Stellungen der Linien sind in allen Baumrekonstruktionsverfahren identisch, obgleich die statistische Unterstützung nur in der bayesianischen Inferenz maximale Werte erreicht.

Topologische Inkongruenz zwischen den gezeigten Bäumen der Abbildung 17 bis Abbildung 19 bedingt sich durch unterschiedliche theoretische Konzepte, die den Stammbaum-Algorithmen zu Grunde liegen, sowie durch unterschiedliche Suchverfahren zur Baumrekonstruktion. Chromosomale, heterozygote Gene gewähren jedoch gegenüber den mt-Genen einen alternativen Einblick in die Stammesgeschichte (z.B. Antunes et al. 2002). Das mütterlich vererbte Organellengenom repräsentiert nur einen kleinen Ausschnitt der evolutionären Geschichte eines sich sexuell fortpflanzenden Lebewesens (z.B. Avise & Wollenberg 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Kerngene für die Rekonstruktion der Phylogenie eurasischer Viperinae verwendet. Obwohl das Sequenzalignment 3514 Positionen aufweist, reicht die phylogenetische Information nicht aus, die Verzweigung der Topologie auch statistisch abzusichern. Inkongruenz zwischen Kern- und Mitochondriengenen ist ein bekanntes evolutionäres Phänomen (z.B. Shaw 2002). Die phylogenetische Aussage des Kerngen-Baumes muss mit Vorsicht interpretiert

werden und kann nicht direkt mit den sehr viel schneller evolvierenden mt-Genen gleichgesetzt werden.

Der Baum aus Abbildung 21 bestätigt die mt-Verwandtschaft nur in Teilen. Seine phylogenetische Information bringt zugleich neue Aspekte der Phylogenie zu Tage, die allerdings nicht immer schlüssig sind und teilweise mit hoher statistischer Unsicherheit behaftet sind.

Die Berg- (*Montivipera*) und Levanteottern (*Macrovipera*) bilden monophyletische Kladen mit maximaler statistischer Unterstützung. Phylogenetische Signale beider Genome tragen äquivalente stammesgeschichtliche Informationen. Innerhalb der Bergottern bildet *Montivipera xanthina* paraphyletische Linien, die damit der mitochondrialen Monophylie widersprechen. Die Sequenzen enthalten möglicherweise zu wenig phylogenetisch informative Signale (Sequenzdivergenz <0,65%) oder der Prozess des „Lineage-sorting“ ist wegen hoher Allel-Variabilität noch nicht abgeschlossen (siehe Avise 2007 und Diskussion Kapitel 7). Eine Vermischung durch Introgression und Hybridisierung halte ich für unwahrscheinlich.

Interessanterweise vermögen die phylogenetischen Informationen der Kerngene tief liegende Verzweigungen nicht zuverlässig aufzulösen. Die basale Polytomie des Baumes ist nur durch den Befehl „Allcompat“ in dichotome Verzweigungen auflösbar. Der Befehl fügt kompatible Gruppen zu der bestehenden Topologie und löst damit Polytomien auf. *Daboia russelii* ist in Übereinstimmung mit proteinkodierenden mt-Genen das Schwestertaxon von *Macrovipera*. *Daboia palaestinae* und *D. mauritanica* (s.l.) stehen basal und gruppieren nicht mit *D. russelii*. Die Paraphylie von *Daboia* dürfte ein Artefakt fehlender phylogenetischer Signale sein.

Kerngene führen die europäischen Viperinae der Gattung *Vipera* (s.l.) auf eine gemeinsame Stammlinie zurück und bestätigen damit die Mitochondrien-Phylogenien von Lenk et al. (2001) und Garrigues et al. (2005).

Stammesgeschichtliche Beziehungen innerhalb *Vipera* (s.l.) lassen sich mit den Kerngenen nicht sicher rekonstruieren. Mit Ausnahme von *kaznakovi* und *seoanei* bilden alle OTUs systematisch logische Gruppen. Die Schwesterbeziehung zwischen *seoanei* und *kaznakovi* ist taxonomisch nicht existent. Beide Arten besetzen in Galicien und am Schwarzen Meer äquivalente ökologische Nischen, die auf konvergente oder parallele Entwicklung schließen lassen. Eine gemeinsame phylogenetische Abstammung erscheint nicht plausibel und ist auf homoplastische Effekte zurückzuführen.

Die Hypothese einer gemeinsamen Abstammung von *V. latastei* und *V. renardi* ist statistisch nicht abgesichert und möglicherweise ebenso ein Artefakt, wie die Beziehung zwischen

*seoanei* und *kaznakovi*. Die Verwandtschaft ist morphologisch noch nie postuliert worden (z.B. Saint Girons 1978).

In dem Kerngensatz sind die afrikanischen Vipern der Gattung *Bitis* nicht die Schwestergruppe von *Cerastes* und *Echis*, wie von Wüster et al. (2008) angenommen wird. Die Kerngene zeigen mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit, dass die eurasischen Viperinae mit *Echis* und *Cerastes* einen gemeinsamen Stammlinienvertreter hatten. Eine gemeinsame Abstammung von *Echis* und *Cerastes* wird aufgrund von Schuppenähnlichkeiten von Joger & Courage (1999) postuliert, konnte molekulargenetisch von Herrmann & Joger (1995), Herrmann et al. (1999) sowie Lenk et al. (2001) jedoch nicht bestätigt werden. Zunächst bestätigten Wüster et al. (2008) eine mögliche Monophylie der beiden Gattungen, die jedoch erst durch Pook et al. (2009) statistisch bewiesen wurde.

Gen-Genealogien können grundsätzlich von Artstammbäumen abweichen, ohne die wahre organismische Abstammung abzubilden (z.B. Avise & Robinson 2008). Die zugrunde liegenden Hypothesen und deren Folgen sind seit Langem bekannt (Hudson 1983, Tajima 1983, Takahata & Nei 1985, Neigel & Avise 1986, Avise & Robinson 2008). Unterschiedliche Vorgänge können die wahre evolutionäre Geschichte verzerren. So können analoge, konvergente oder parallele Entwicklungen Verwandtschaften nahelegen, obwohl es keine gemeinsame Abstammung gibt (z.B. Page & Holmes 2001). Dazu zählen beispielsweise Genduplikationen, die als Paraloge im Genom koexistieren und aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Vergleich nicht homologer Gene führen können. Methodisch sind Paraloge jedoch nur äußerst schwer nachweisbar (Townsend et al. 2008). Aber auch Genealogien funktional entsprechender Gene (Orthologe) können trotz ihrer gemeinsamen Abstammung zu Art-Stammbäumen diskordant sein, weil die Auftrennung von Polymorphismen im Verlauf der Kladogenese nicht mit der organismischen Speziation korreliert. Das Phänomen der idiosynkratischen Aufspaltung von Allel-Polymorphismen bezeichnet Avise & Robinson (2008) als Hemiplasie.

Gerade in Genen mit wenigen variablen Sequenzpositionen (Rag1, Bach1) können auch asymmetrische Substitutionen die phylogenetische Rekonstruktion erschweren. So wurde bekannt, dass bestimmte Sequenzpositionen, die keine funktionalen Änderungen der Proteine nach sich ziehen, über einen bestimmten Zeitraum mehrfach substituiert wurden und dann in einem „abgeschalteten“ Zustand verweilen (Heterotachie) (z.B. Lockhart et al. 1996, Lopez et al. 1999, 2002, Philippe et al. 2000, Inagaki et al. 2004).

## 6 Divergenzzeiten eurasischer Viperinae

### 6.1 Einleitung

Das Konzept der molekularen Uhr bietet eine populäre und aussagekräftige Methode, die evolutionäre Geschichte von Organismen zu rekonstruieren (Sanderson et al. 2004). Die Kenntnis über den zeitlichen Ursprung von Organismen gewährleistet wertvolle Einblicke in geologische und klimatologische Prozesse, die zur Diversität heutiger Arten geführt haben.

Nach der Postulierung einer molekularen Uhr, mit konstanten Evolutionsraten zwischen evolutionären Linien, durch Zuckerkandl & Pauling (1962, 1965) herrscht breite Übereinstimmung darüber, dass eine globale Uhr nur in den seltensten Fällen zutrifft (Wu & Li 1985, Britten 1986). Stattdessen fluktuieren Evolutionsraten im Laufe der Zeit (Heterotachie) und zwischen evolutionären Linien (z.B. Bromham & Penny 2003). Dennoch existiert eine Vielzahl von Methoden, die die fluktuierenden Evolutionsraten modellieren und die Berechnung robuster Chronogramme ermöglichen (z.B. Aris-Bousou & Yang 2003, Cutler 2000, Drummond et al. 2006, Huelsenbeck et al. 2000, Kishino et al. 2001, Rambaut & Bromham 1998, Sanderson 1997, 2002, Yang & Rannala 2006, Yoder & Yang 2000). Dazu zählen die relaxierten Uhren der Programmpakete r8s (Sanderson 2003), multidivtime (Thorne & Kishino, 2002) in Kombination mit PAML (Yang 1997), BEAST (Drummond & Rambaut 2007), Phylobayes (Lartillot et al. 2009) und TreeTime (Himmelman & Metzler 2009).

Die neuen relaxierten Methoden erlauben einen flexibleren Umgang mit Kalibrierungstechniken. Erst durch die Eichung mit Kalibrierungspunkten erhält eine Phylogenie ihre zeitliche Dimension. Als Eichpunkte interner Knoten können Fossilüberlieferungen oder biogeographische Ereignisse dienen (z.B. Ho & Phillips 2009), die jedoch a priori Kenntnisse über die Verwandtschaftsbeziehungen der Taxa voraussetzen. Obwohl Fossilüberlieferungen als die geeignetste Quelle unabhängiger Kalibrierungen erachtet werden (Magallón & Sanderson 2001, Marshall 1990, Sanderson 1998), ist ihre Verwendung mit einigen Nachteilen behaftet. Gandolfo et al. (2008) nennen fünf Gründe für Unsicherheiten der Fossilkalibrierung: 1) Fossilerhaltung, 2) taxonomische Identifizierung, 3) Identifizierung fossiler Homologien, 4) Probenumfang, 5) Bestimmung des Fossilalters.

Westpaläarktische Vipern sind fossil erstmals aus der Säugerzone MN1 des frühen Miozäns überliefert (siehe Szyndlar & Rage 1999). Das älteste bekannte Vipern-Fossil aus Europa - *Vipera antiqua* (Szyndlar & Böhme 1993) – gehört nach Szyndlar & Rage (1999) dem *Vipera aspis*-Komplex an. Viperinae sind vom Beginn des Miozäns bis in die Gegenwart ein



Bestandteil der westpaläarktischen Fauna (Szyndlar & Rage 1999). Nach heutiger systematischer Auffassung sind sie mit acht Gattungen (einschl. *Cerastes* und *Echis*) in der Westpaläarktis vertreten (z.B. Bruno 1985, Joger 1984, Joger & Stümpel 2005c, Phelps 2010).

Das mediterrane Becken ist sowohl in der Gegenwart als auch in der Vergangenheit ein Hotspot für Biogeographie und Paläobiogeographie mit außerordentlich hoher Biodiversität und einem hohen Anteil regionaler Endemismen (z.B. Cox et al. 2009).

Die tektonische Evolution der Tethys und Paratethys war in Verbindung mit Klima- und Meeresschwankungen treibende Kraft von Speziationsprozessen. Wechselnde Seewege haben Landmassen voneinander isoliert und ihre Biota in distinkte Gruppen separiert. Meerestransgressionen ließen wiederholt Landbrücken entstehen, die Faunenaustausch zwischen unterschiedlichen paläobiogeographischen Provinzen ermöglichten (z.B. Böhme 2003, Gheerbrant & Rage 2006). „Dispersal“ und „Vikarianz“ lassen sich in der fossilen Überlieferung einiger Tiergruppen zweifelsfrei nachweisen (z.B. Agustí et al. 2006, Böhme 2003) und mit paläogeographischen Rekonstruktionen (z.B. Popov et al. 2004) abgleichen. In historischer Zeit haben Klimawechsel insbesondere bei poikilothermen Organismen zu Arealausbreitung und Aussterbeprozessen geführt (Böhme 2003) und so die Biodiversität der zirkummediterranen Region beeinflusst. Geologische Ereignisse sind dazu geeignet, Divergenzzeiten fossildatierter Chronogramme zu validieren (z.B. Bell & Donoghue 2005, Conti et al. 2002, Sytsma et al. 2004). Geologische Kalibrierungspunkte phylogenetischer Knoten basieren auf Annahmen und bergen das Risiko von Zirkelschlüssen, wenn sie für die Rekonstruktion biogeographischer Szenarien verwendet werden (Conti et al. 2004, Magallón 2004).

Der einzige direkte Nachweis für das Alter einer Tiergruppe ist der Fossilnachweis (z.B. Page & Holmes 2001). Für die zeitliche Skalierung von Phylogenien gibt es jedoch nur wenige Eichpunkte, die einer kritischen Prüfung standhalten (Benton & Donoghue 2007). Zudem sind paläontologische Daten nur als Minimumgrenzen für die Kalibrierung zu verwenden (z.B. Benton & Ayala 2003) und fossile Kalibrierungen tendieren dazu, die wahren Divergenzzeiten zu unterschätzen (Inoue et al. 2010).

Wenn Divergenzzeiten in einer Phylogenie mit geologischen Zeitskalen kalibriert werden, kann jeder Knoten als sekundärer Kalibrierungspunkt verwendet werden, wenn kein Bias vorhanden ist. Sekundäre Kalibrierungspunkte aus einer robusten Phylogenie sind akkurater als unsichere primäre Eichpunkte (Hedges & Kumar 2004).

Divergenzzeiten-Analysen zum Ursprung eurasischer Viperiden wurden bisher nur von wenigen Autoren durchgeführt. In der frühesten Studie (Herrmann et al. 1992b) verwendeten

die Autoren noch immunologische Distanzen von Blutserum-Albuminen zur Datierung und ermittelten ein Alter von ca. 15 Mio. Jahren für den MRCA eurasischer Vipern. In den nachfolgenden Publikationen wurden bereits Gensequenzen verwendet. So berechneten Ursenbacher et al. (2008) das Alter rezenter *Vipera ammodytes*-Linien. Wüster et al. (2008) datieren den Ursprung der Viperidae (Viperoidea) für einen sehr umfangreichen Datensatz auf 47,4 Mio. Jahre. Der letzte gemeinsame Vorfahre eurasischer Viperinae (Viperidae) hat nach ihren Schätzungen vor 39,7 Mio. Jahren gelebt.

Fossile Überlieferungen eurasischer Viperinae (Viperidae) bieten jedoch weder exakte Kalibrierungspunkte, noch sind sie zur Validierung berechneter Divergenzzeiten geeignet. Wüster et al. (2008) nutzen zur zeitlichen Eichung des Viperidae-Subzweiges (Viperoidea) drei interne Kalibrierungspunkte, von denen einer innerhalb eurasischer Vipern gesetzt wurde. Die Autoren nehmen an, die initiale Radiation eurasischer Viperinae habe vor 20 Mio. Jahren begonnen. Tatsächlich ist die Annahme aber nicht ausreichend sicher durch Fossilfunde gestützt. Der Fossilrekord (Szyndlar & Rage 1999) zeigt, dass eine Radiation eurasischer Viperinae in die Linien *Vipera*, *Macro-*, *Montivipera* und *Daboia* erst sicher aus der Biozone MN 4 zu belegen ist (siehe auch Kapitel 9).

Viperiden besiedeln alle Regionen der Westpaläarktis und haben hier eine höhere Diversität erreicht als in der Ostpaläarktis. Die komplexe Paläogeographie der zirkummediterranen Region war in Verbindung mit Klimaveränderungen treibende Kraft für Speziationsprozesse und für die Aufspaltung in evolutionäre Linien.

Es gibt bis dato keinen Versuch, die evolutionäre Geschichte der eurasischen Viperiden in ihrer Gesamtheit zu rekonstruieren und die Ursprünge der einzelnen evolutionären Linien zeitlich zu datieren. Bisherige Publikationen bezogen sich entweder auf die Berechnung von Divergenzzeiten einzelner Gruppen (Ursenbacher et al. 2008, Barbanera et al. 2009) oder haben in Großgruppenphylogenien nur wenige repräsentative Linien berücksichtigt (Wüster et al. 2008).

Ziel des vorliegenden Kapitels ist es, den Ursprung aller wesentlichen westpaläarktischen Viperiden-Linien zeitlich zu datieren. Hierfür wurden vier Gene (Cytb, COI, Rag1, Bach1) von ca. 90% der bekannten Vipern-Linien sequenziert. Die Phylogenie wurde ausschließlich mit sekundären Kalibrierungspunkten (siehe Kapitel 2.5.5 und 4) geeicht und die Divergenzzeiten mit einem relaxierten MCMC-Verfahren (BEAST) berechnet.

## 6.2 Ergebnisse

Divergenzzeiten des verketteten Datensatzes 5434 wurden mit dem Programm BEAST berechnet. Auf die Partitionierung der Gene wurde wegen des einheitlichen Evolutionsmodells verzichtet.

Die in Abbildung 23 gezeigte bayesianische Phylogenie ist relativ robust. Die meisten Knoten haben Posterior-Probabilities > 0,95. Die wesentliche Struktur des Baumes ist weitestgehend mit den MP-, ML- und BI-Phylogenien aus Kapitel 5 kongruent. Aufgrund dessen werden an dieser Stelle nur Unterschiede zwischen den BI-Bäumen (MrBayes, Abb. 17 versus BEAST, Abb. 23) genannt. Die inkongruenten Kladen der vorherigen Analysen (siehe Kap. 5.2.4) bleiben auch zwischen den beiden bayesianischen Analysen strittig. Das mit BEAST berechnete Maximum-Credibility-Chronogramm zeigt *Daboia* als Schwestergruppe zu *Vipera* mit einem robusten PP-Wert von 0,97, während der 50%-Majority-Rule-Konsensusbaum (Abb. 17) *Daboia* als Schwestergruppe zu *Monti-* und *Macrovipera* (PP 1.0) positioniert. Alle weiteren topologischen Unterschiede sind in der BEAST-Analyse nicht durch robuste Posterior Probabilities untermauert und sind daher wenig zuverlässig. *Montivipera xanthina* aus dem Taurus clustert mit der *bornmuelleri*-Gruppe (PP 0,38) und bildet die Schwestergruppe zu Haplotypen aus Lykien und der Ägäis. Mediterrane Levanteottern (*Macrovipera schweizeri*, *M. lebetina lebetina*) sind monophyletisch und stellen die Schwestergruppe zu allen übrigen Taxa dar, während MrBayes den Zweig in der Innengruppe von *M. lebetina* platziert (siehe Abbildung 17). In der *Pelias*-Gruppe (s.l.) ist die phylogenetische Struktur deckungsgleich mit der ML-Analyse (siehe Abbildung 18). *Vipera orlovi* befindet sich an der Basis von *V. renardi* und *V. ursinii* und gruppiert nicht zusammen mit *ursinii*.

Die berechneten Divergenzzeiten des Chronogramms sind für ausgewählte Kladen in Tabelle 16 zusammengefasst.

BEAST datiert den Split zwischen Viperinae und Crotalinae auf 52 Millionen Jahre. Die Stammlinienvertreter von *Echis* und *Cerastes* trennten sich von der eurasischen Schwestergruppe vor 37,3 Mio. Jahren.

Tabelle 16: BEAST-Divergenzzeiten ausgewählter Knoten eurasischer Viperinae des kombinierten mt-nc-Datensatzes 5434. TMRCA = time to most recent common ancestor. Details zur Berechnung siehe Legende der nächsten Abbildung.

Klade (TMRCA)	Alter (Mio. Jahre)	Klade (TMRCA)	Alter (Mio. Jahre)	Klade (TMRCA)	Alter (Mio. Jahre)
<i>schweizeri-obtusa</i>	3,1	<i>spec. nov.-obtusa</i>	6,6	<i>ammodytes-aspis</i>	14,5
<i>ursinii-renardii</i>	3,7	<i>Pelias-Acridophaga</i>	7	<i>Monti-Macrovipera</i>	14,5
<i>seoanei-berus</i>	4,7	<i>aspis-latastei</i>	9,4	<i>Eristicophis-Pseudocerastes</i>	17,4
<i>bornmuelleri-xanthina</i> Ägäis	5,4	<i>palaestinae-mauritanica</i>	10,2	<i>Echis-Cerastes</i>	32,5
<i>latastei-monticola</i>	6,2	<i>latastei-ursinii</i>	13,5	<i>Echis-Pseudocerastes</i>	37,3

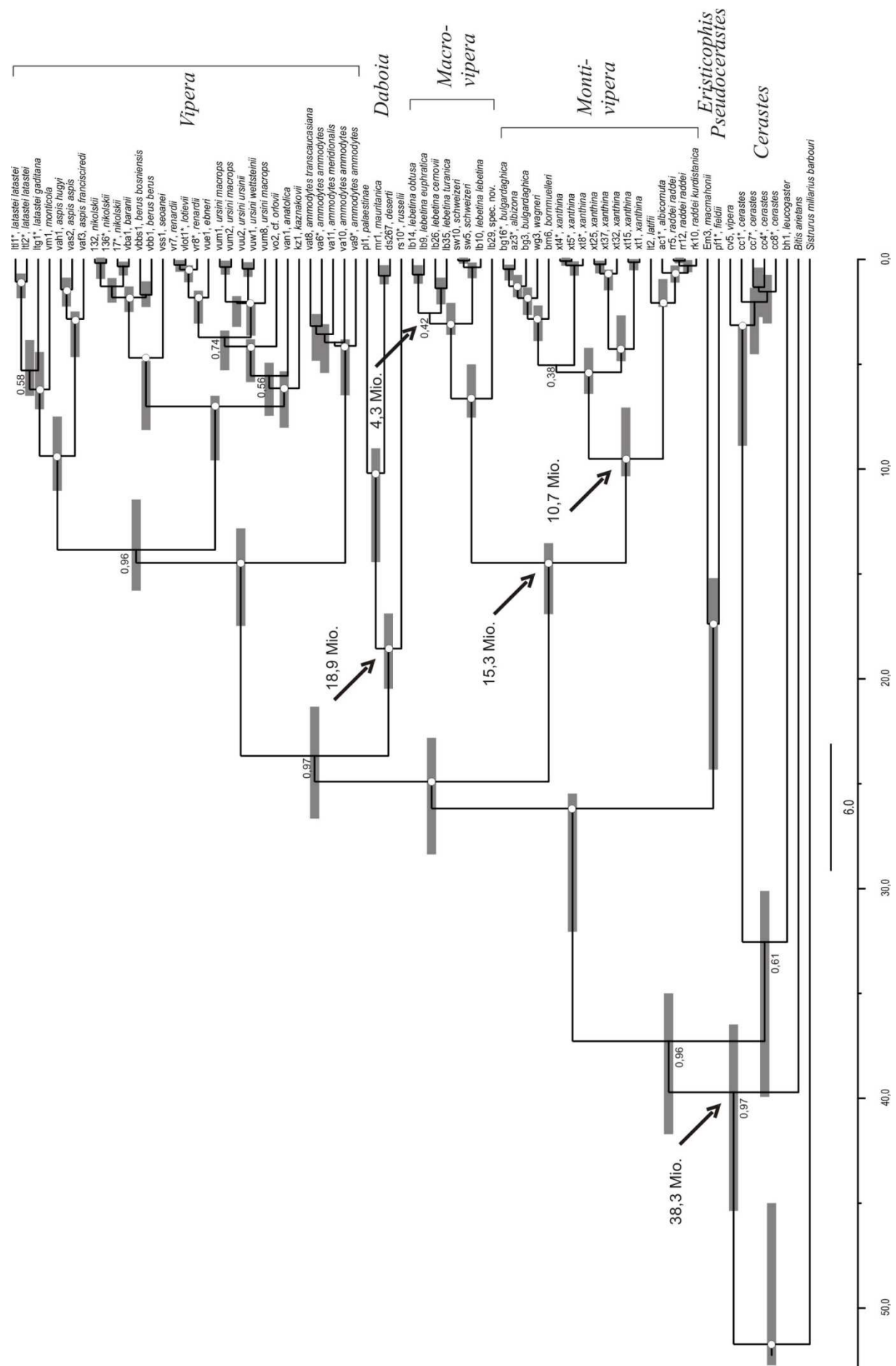


Abbildung 23 (vorherige Seite): BEAST-ultrametric-maximum-credibility-Chronogramm der konkatenierten Datensätze 1920 und 3514. Modelle zur Sequenzevolution wurden getrennt für die Mitochondrien- und Kerngene mit dem Programm MrModeltest (Ronquist & Huelsenbeck 2003) berechnet. Unter Annahme des GTR+I+G Modells sammelten zwei simultane MC<sup>3</sup>-Analysen über 10 Mio. Generationen jeden 200sten Baum. Die ersten 25% wurden als Burnin verworfen und für die Berechnung des Konsensusbaumes wurden nur Generationen der stabilen Phase herangezogen. Die Konvergenz sowie die „Effective-sampling-size“ (ESS) der Ketten wurde mit dem Programm Tracer (Rambaut & Drummont 2007) überprüft. Konfidenzintervalle für Knotenalter sind als graue Balken dargestellt. Maximale Posteriorwahrscheinlichkeiten der Kladen (1.0) sind durch weiße Kreise symbolisiert. Geringere Wahrscheinlichkeiten sind direkt angegeben. Schwarze Pfeile zeigen auf die verwendeten Kalibrierungspunkte (*Bitis* vs. eurasische Stammgruppe, *D. russellii* vs. *D. mauritanica*, *Macrovipera* vs. *Montivipera*, *M. raddei* vs. *M. xanthina*, *M.l. obtusa*, vs. *M.l. turanica*).

Bemerkenswert ist, dass die Vertreter der ältesten Zweige auch ökologisch von ihrer Innengruppe getrennt sind. Bei den rezenten Gattungen *Echis*, *Cerastes*, *Pseudocerastes* und *Eristicophis* handelt es sich ausschließlich um Wüstenbewohner. *Echis* und *Cerastes* trennten sich bereits vor 32,5 Mio. Jahren und die Stammgruppe von *Pseudocerastes* und *Eristicophis* von der eurasischen Innengruppe vor 26,2 Mio. Jahren. Die Radiation der beiden artenreichen Gruppen *Vipera* und *Macro-*, *Montivipera* begann zeitgleich vor 14,5 Mio. Jahren. Die Gattung *Daboia*, ist mit vier Arten ein relativ artenarmer aber hoch divergenter Zweig. Der Split zwischen den Arten *D. palaestinae* und *D. mauritanica* geht auf 10,2 Mio. Jahre zurück. Nach der Radiation von *Vipera* (s.l.) vor 14,5 Mio. Jahren spaltete sich in geologisch kurzem Zeitraum die Stammgruppe von *V. aspis* und *V. latastei* von der *Acridophaga*-Gruppe ab (13,5 Mio. Jahre). Auch wenn der Probenumfang nicht alle bekannten Taxa repräsentiert, gehen die untersuchten Haplotypen von *Vipera ammodytes* auf eine junge Kladogenese zurück. Der Knoten von *V. aspis* versus *V. latastei* ist mit 9,4 Mio. Jahren relativ alt. Etwas jünger ist der letzte gemeinsame Vorfahre von *Pelias* und *Acridophaga*, der auf 7 Mio. Jahre zurückgeht.

### 6.3 Diskussion

Das Chronogramm der Abbildung 23 zeigt eine robuste Topologie mit hohen Posterior-Probabilities und eng gefassten Konfidenzintervallen.

Der Split zwischen Viperinae und Crotalinae fällt auf das frühe Eozän (Ypresium) und liegt damit innerhalb des Konfidenzintervalls der Divergenzzeitanalyse von Wüster et al. (2008). Nach Angaben der Autoren liegt das Alter des unmittelbaren Vorfahren (MRCA) der Viperidae zwischen 57,4 Mio. (Max.) und 38,1 Mio. (Min.) Jahren (Mittelwert 47,4 Mio. Jahre).

Die Trennung der beiden Linien korreliert zeitlich mit dem Paläo-Eozänen-Klima-Maximum (PETM), in dessen Folge es auf allen nördlichen Kontinenten und vermutlich auch in Afrika

zu dramatischen Aussterbeereignissen der Biota und latitudinalen Verschiebungen von Verbreitungsarealen kam (Beard 2002, Bowen et al. 2002). Der klimatische Umbruch könnte in Verbindung mit tektonischen Ereignissen zum Aufsplitten der Viperiden-Stammart geführt haben.

Bei der heutigen Kronengruppe von *Echis* und *Cerastes* handelt es sich um zwei sehr alte evolutionäre Linien, die anders als bei Wüster et al. (2008) mit eurasischen Taxa clustern, anstatt mit der afrikanischen *Bitis* zu gruppieren. Trotz der vollkommen unterschiedlichen Eichpunkte zeigen beide Analysen eine hohe zeitliche Übereinstimmung. Wüster et al. (2008) ermitteln ein Alter von 33,0 Mio. Jahren für den genannten Split, versus 32,5 Mio. Jahre der vorliegenden Analyse.

Innerhalb der eurasischen Kronengruppe (ohne *Echis* und *Cerastes*) stellen die Schwestergruppen *Eristicophis* und *Pseudocerastes* zwei alte Zweige dar, die im Burdigalium vor 17,4 Mio. Jahren voneinander divergierten. Die Divergenzzeit stimmt mit den Schätzungen von Wüster et al. (2008) überein. Die Arten beider Gattungen zeigen extreme Anpassungen an aride Klimate und bewohnen die Wüstengebiete des Nahen Ostens, einschließlich Pakistan und Afghanistan (z.B. Joger 1984). Die Trennung des letzten gemeinsamen Vorfahren fällt in einen Zeitraum, in dem der Nahe Osten starken geodynamischen Veränderungen unterworfen war. Die *Gomphotherium*-Landbrücke ermöglichte im Burdigalium vor ca. 18 Mio. Jahren Faunenaustausch über die kleinasiatisch-levantinische Landroute (z.B. Böhme 2003). Möglicherweise wurde die Stammart der Gattungen *Eristicophis* und *Pseudocerastes* genauso wie der Stammlinienvertreter von *Daboia* (sekundärer Kalibrierungspunkt) durch eine offene Seeverbindung zwischen Indischem Ozean, Paratethys und Mediterran in separate evolutionäre Linien getrennt (siehe auch Kapitel 9). In dem feuchtwarmen Klima des Miozäns (Mosbrugger et al. 2005) konnte der Stammlinienvertreter von *Daboia* sein Areal über den *Gomphotherium*-Landkorridor von Südostasien bis an die Atlantikküste ausdehnen. Die heutige Verbreitung von *Daboia* erstreckt sich von Indochina bis nach Westmarokko (z.B. Phelps 2010). Die ökologischen Bedingungen konnte der Ahne von *Eristicophis* und *Pseudocerastes* offenbar nicht für die Expansion seines Areales auf den afrikanischen Kontinent nutzen, weil die Gattungen heute nicht zur Herpetofauna der nordafrikanischen Wüsten und Halbwüsten gehören.

Böhme (2003) untersuchte den Effekt der *Gomphotherium*-Landbrücke auf die Ausbreitung von ektothermen Vertebraten anhand von Fossilüberlieferungen. Reptilien nutzten demnach die Passage in zwei Zeitintervallen. Squamaten mit afrikanischem Ursprung, wie die Chamaeleonidae, wanderten zum Ende der Säugerzone MN2/MN3 nach Europa ein,

während Cordylidae erst vom Beginn der Säugeterzone MN4 aus europäischen Fossilagerstätten bekannt sind.

Die Stammlinienvertreter von *Montivipera*, *Macrovipera*, *Vipera* (s.l.) haben ihren Ursprung im mittleren Miozän (Langhium, Serravallium). Während sich die Trennung zwischen *Macrovipera* und *Montivipera* sowie *M. xanthina* versus *M. raddei* durch vikariierende geologische Ereignisse erklären lässt, sind geologische Szenarien, die zur Trennung in die einzelnen *Vipera*-Linien geführt haben, nicht so offensichtlich rekonstruierbar.

Der BEAST-Baum zeigt *Daboia* als Schwestergruppe zu *Vipera* (s.l.) (vergl. Wüster et al. 2008) und unterscheidet sich damit von allen anderen bayesianischen Stammbäumen. In Übereinstimmung mit morphologischen Ähnlichkeiten zeigen Stammbaumrekonstruktionen mit Bayes (Abbildung 17) und Phylobayes (Abbildung 15) *Daboia* als Schwestergruppe von *Macro*- und *Montivipera*. Mit der phylogenetischen Position von *Vipera* (s.l.) verändert sich das Alter des Stammlinienvertreters. In der BEAST-Analyse liegt der Ursprung des Stammlinienvertreters von *Vipera* (s.l.) bei 23,7 Mio. Jahren (95% Konfidenzintervall 21,5-26,6 Mio. Jahre). Die älteste fossile Viper aus Europa ist *Vipera antiqua* (Szyndlar & Böhme 1993). Sie wird dem *Vipera aspis*-Komplex zugerechnet (Szyndlar & Böhme 1993) und stammt aus der Säugeterzone MN1, die vor 24,1 (Augusti et al. 2001) oder 23,8 (Berggren et al. 1985) Mio. Jahren begann und vor 22,1 (Augusti et al. 2001) bzw. 22,3 Mio. Jahren endete (Berggren et al. 1985). Einige Knotenalter des BEAST-Chronogramms unterschätzen das tatsächliche Alter der Linien wahrscheinlich erheblich. Zwar liegt das Fossilalter im 95%-Konfidenzbereich, doch die Identifizierung des Fossils als *aspis*-Verwandte setzt bereits eine Diversifizierung der Viperiden in unterschiedliche *Vipera*-Linien voraus. Demnach müsste das tatsächliche Alter des Stammlinienvertreters deutlich über 23,8 Mio. Jahren liegen. Nach Hedges & Kumar (2004) unterschätzt der Fossilrekord die tatsächliche Divergenz zweier Linien immer erheblich. Plausibler erscheint der Ursprung von *Vipera* (s.l.) im späten Eozän zu liegen. Die in diesem Zeitraum einsetzende weltweite klimatische Abkühlung (z.B. Mosbrugger et al. 2005) könnte zur Aufspaltung eurasischer Viperiden in eine kältetolerante Gruppe (Stammarten der rezenten Gattung *Vipera*) und eine mediterran subtropisch verbreitete Gruppe (orientalische Vipern) geführt haben (siehe Kapitel 9). Aus dieser Epoche sind drastische Reorganisationen der Biota bekannt (Meng & McKenna 1998, Dupont-Nivet et al. 2007).

Innerhalb *Vipera* (s.l.) hat der *Acridophaga*-Subzweig eine starke Radiation erfahren. Die ältesten Haplotypen repräsentieren die Arten *kaznakovi*, *anatolica* und *orlovi*. Ihre heutige punktuelle und isolierte Verbreitung (z.B. Orlov & Tuniyev 2005, Tuniyev & Ostrovskikh 2001, Eiselt & Baran 1970) zeigt, dass es sich um Relikte einer ehemals im Vorderen Orient weit verbreiteten *Acridophaga*-Stammart handelt.

Bei den Vorkommen von *Vipera monticola* und *V. latastei gaditana* in Nordafrika handelt es sich ebenfalls um Relikte einer früheren Besiedlungswelle (z.B. Brito et al. 2008). Die Divergenzzeiten zwischen den nordafrikanischen Taxa und *V. latastei* von der Iberischen Halbinsel korrelieren mit geologischen Ereignissen. Während der messinischen Salinitätskrise wurde das Mittelmeer von der atlantischen Zirkulation abgetrennt (Hsü et al. 1973). Eine Landbrücke stellte terrestrischen Kontakt zwischen Europa und Nordafrika her und ermöglichte den Austausch von Biota. Der Meeresspiegel sank infolge der Verdunstung dramatisch und es wurden kilometerdicke Evaporite in den Subbecken des Mittelmeeres abgelagert (Hsü et al. 1973). Die messinische Salinitätskrise endete mit der Zanklean-Flutung des Mittelmeeres vor 5,33 Mio. Jahren, in der das Mittelmeerbecken innerhalb weniger tausend Jahre wieder aufgefüllt wurde (Blanc 2002). Seither hat es keine Landverbindung mehr zwischen der Iberischen Halbinsel und dem afrikanischen Kontinent gegeben. *Vipera monticola* aus dem Hohen Atlas in Marokko ist seit 6,2 Mio. Jahren und *V. l. gaditana* aus Tunesien seit 5,3 Mio. Jahren von der nächst verwandten Unterart aus Iberien getrennt.

Für andere Reptilien mit ähnlichem Verbreitungsmuster wurden vergleichbare Divergenzzeiten berechnet. Nach Carranza et al. (2006) trennten sich die Schwesterarten *Hemorrhois hippocrepis* (Iberien) und *Hemorrhois algirus* (Nordafrika) vor 4-7 Mio. Jahren. Die Divergenzzeiten zwischen verwandten Arten des *Podarcis hispanica*-Komplexes (Pinho et al. 2006) sowie den Arten *Acanthodactylus erythrurus* (Harris et al. 2004) und der Gattung *Salamandra* (Escoriza et al. 2006) stützen ebenfalls die Zanklean-Flutungshypothese, die bikontinental verbreitete Arten in Geschwisterarten getrennt hat.

Der während der messinischen Salinitätskrise bis zu 1000 m gesunkene Meeresspiegel eröffnete im gesamten Mittelmeergebiet neue transmediterrane Landkorridore, über die terrestrische Organsimen auch isolierte Inseln besiedeln konnten. Zypern, das seit dem frühen Miozän auf ein Niveau nahe oder oberhalb des Meeresspiegels angehoben wurde (Garfunkel 1998), war nur während der messinischen Salinitätskrise über eine terrestrische Landverbindungen mit der Levante und Kleinasien verbunden. Die BEAST-Analyse datiert die Trennung der zypriotischen Levanteottern von den festländischen Populationen auf ein Alter von 3,1 Mio. Jahren (95%-Konfidenzintervalle 2,2-3,5 Mio. Jahre). Zanklean-Flutung und Divergenzzeit stimmen in diesem Fall nicht eindeutig überein. Terrestrische Verbindungen in jüngerer Zeit sind nicht bekannt (Davis 2003).

Im Konflikt zu bisher publizierten Hypothesen steht vor allem die Divergenzzeit zwischen den Kykladen-Vipern (*Macrovipera schweizeri*) und den nächsten Verwandten von Zypern (*M. lebetina lebetina*). Nilson & Andrén (1988) fassen *M. schweizeri* als eigene valide Art auf, die sich bereits vor 3-5 Mio. Jahren von den anatolischen Populationen trennte und sich



durch Zwergenwuchs und spezielle ökologische Strategien von anderen Levanteottern unterscheidet (Nilson 2005).

Die Kykladen liegen auf dem Hellenischen Bogen, einer tektonisch aktiven Zone, die sich mehrere Millimeter pro Jahr auf die Subduktionszone (Hellenischer Graben) zwischen afrikanischer und anatolisch-ägäischer Platte zubewegen. Die Region war im Miozän eine zusammenhängende Landmasse (Dermitzakis & Papanikolaou 1981), die im Laufe der Zeit durch tektonische Prozesse auseinander brach. Die geringen Meerestiefen im östlichen Ägäischen Meer lassen vermuten, dass während der messinischen Salinitätskrise für Organismen passierbare Landrouten zwischen den Kykladen, Anatolien und Zypern bestanden. Die Divergenz zwischen den beiden Populationen (Zypern versus Kykladen) ist jedoch mit 382.700 Jahren (95%-Konfidenzintervalle 0,23-0,82 Mio. Jahre) deutlich zu jung, als dass man sie auf die Zankleanflutung zurückführen könnte und deutlich zu alt, um sie mit der Verschleppung durch Seefahrtshandel erklären zu können.

Der Fund eines dem Kykladen-Typ identischen Haplotypes an der türkischen Südküste (Mersin), 850 km Luftlinie von den Kykladen entfernt, verleiht der Diskussion neue Impulse und erlaubt die Schlussfolgerung, dass der letzte gemeinsame Vorfahre (MRCA) beider Linien (Zypern und Kykladen) im Mittelpleistozän ein geschlossenes Gebiet entlang der türkischen Südküste bewohnte und während eines eustatischen Meerestiefstandes Zypern kolonisierte. Nach Rohling et al. (1998) lag der globale Meeresspiegel vor 440- und 340-tausend Jahren 140 m unter dem heutigen Meeresniveau. Rabineau et al. (2006) wiesen für vergleichbare Zeiträume Tiefststände von 150 m unterhalb der heutigen Meereshöhe nach. Auch wenn nach heutigem Wissen zu dieser Zeit kein Landweg zwischen Anatolien und Zypern bestand, so wurde zumindest die zu überwindende Distanz deutlich reduziert. Schwimmende Kreuzottern wurden in der Ostsee mehrere Kilometer vom Ufer entfernt beobachtet (Völkl & Thiesmeier 2002) und nahezu alle Mittelmeerinseln wurden im Pleistozän während Meerestiefstständen von Säugetieren kolonisiert (z.B. Marra 2005, Palombo 2007). Dazu zählen Inseln wie Sardinien, Sizilien, Kreta, Zypern und Tilos, die unter anderem von Elefanten erobert wurden (Palombo 2007). Eine aktive Ausbreitung der Levanteotter ist also durchaus denkbar. Weitere Anhaltspunkte für eine erdgeschichtlich junge Kolonisierung Zyperns liefern Schmidtler et al. (2009). Die Zwergnatter *Eirenis levantinus* aus den anatolischen Misis-Bergen ist mit Populationen der Insel Zypern (Kyrenaika) näher verwandt als mit benachbarten festländischen Populationen der Amanos-Berge bei Osmaniye und Bahçe (Schmidtler et al. 2009).

Nach Simpson (1965), Dermitzakis & Sondaar (1978) und Sondaar et al. (1996) (vergl. auch Marra 2005) steht die Zusammensetzung und der Vergleich zwischen Insel- und

Festlandfaunen in direktem Zusammenhang zur Art und Weise der Besiedlung. Eine balancierte Fauna mit großer Ähnlichkeit zu der des Festlandes deutet auf eine breite Landverbindung hin, die als Korridor für die Ausbreitung diente. Eine verarmte aber stabile Fauna mit geringem Inselendemismus spricht für einen Korridor, der nur selektiv passierbar war und so Ausbreitungsereignisse gefiltert hat. Unbalancierte Faunen mit Elementen des Festlandes lassen auf schmale Meerengen („pendel route“) schließen, die nur von guten Schwimmern durchquert werden konnten. Ausschließlich endemische Inselfaunen sprechen für zufällige Überquerung von breiten Seestraßen („sweepstake“). In Anlehnung an die Besiedlung klassifiziert Alcover (1998) Inseln in drei Typen: Ozeanische Inseln, die niemals in Verbindung zum Festland standen, Ozean ähnliche Inseln, die temporär mit dem Festland in Verbindung standen und kontinentale Inseln, die über lange Zeiträume mit dem Festland in Kontakt standen.

Die Reptilienfauna von Milos (Kykladen) hat große Ähnlichkeiten zu der des Festlandes und weist nur wenige endemische Taxa wie *Podarcis milensis*, *Lacerta trilineata hansschweizeri* und *Natrix natrix schweizeri* auf. Etwas größer ist der Anteil endemischer Reptilien auf Zypern. Neben den Arten *Phoenicolacerta troodica* und *Hierophis cypriensis* wurden eine Reihe endemischer Subspezies beschrieben (*Cyrtopodion (Mediodactylus) kotschy fitzingeri*, *Ophisops elegans schlueteri*, *Laudakia stellio cypriaca*, *Macrovipera lebetina lebetina*, *Dolichophis jugularis cypriacus*, *Telescopus fallax cyprianus* und *Natrix natrix cypriaca*) (vergl. Göçmen et al. 2008). Schmidtler et al. (2009) bezeichnen die Herpetofauna Zyperns als verarmte aber modifizierte Kopie der Herpetofauna der östlichen Levante.

Auch wenn in jüngerer Zeit die geologische Evolution des östlichen Mittelmeeres untersucht wurde, gibt es bisher keine klaren geologischen Hinweise auf eine terrestrische Verbindung zwischen Zypern und dem Festland (z.B. Ozel et al. 2007). Dennoch spricht die große Übereinstimmung zwischen der Herpetofauna Zyperns und der des Festlandes für die Besiedlung über einen terrestrischen Landkorridor. Göçmen & Böhme (2002) bemerken, dass ein höherer Anteil Endemiten zu erwarten wäre, sollte die letzte Landverbindung Zyperns zum anatolischen Festland im Miozän bestanden haben. Alle Hinweise wie das Artenspektrum und die geringe Endemitenzahl sind mit der Divergenzzeit konkordant und sind das Resultat einer geologisch jungen Besiedlung im Pleistozän. Die molekulare Uhr von Kasapidis et al. (2005) datiert die Trennung zwischen Insel- und Festlandpopulationen des Geckos *Cyrtopodion kotschy* allerdings auf ein Intervall zwischen 7,9 und 2 Mio. Jahre. Die Berechnung basiert jedoch nur auf einem geologischen Kalibrierungspunkt.

Vor dem Pleistozän war Zypern für mehr als 5 Millionen Jahre isoliert (Davis 2003), das beweist die verarmte, unbalancierte Paläofauna mit endemischen Flusspferden (*Phanourios*

*minutes*) und Zwergelafanten (*Elephas cypristes*) (Marra 2005, Palombo 2007), die jedoch dem pleistozänen Klimawandel nicht Stand halten konnten und ausstarben (Marra 2005).

Eustatische Meerestiefstände im Pleistozän waren die Voraussetzung zur Kolonisierung Zyperns und der Kykladen. So hat vermutlich der letzte gemeinsame Vorfahre (MRCA) der beiden evolutionären Levanteotter-Linien ein geschlossenes Gebiet entlang der türkischen Südküste bewohnt und konnte dann zu unterschiedlichen Zeitpunkten erst Zypern und später auch den Kykladen-Archipel besiedeln.

In Anbetracht der Tatsache, dass der Kykladen-Haplotyp auch auf dem türkischen Festland entdeckt wurde, muss allerdings auch die Vermutung diskutiert werden, dass eine der Populationen einen nicht autochthonen Ursprung hat und auf anthropogene Transplantation durch Seehandel zurückgeht. Seehandel zwischen Anatolien und den Kykladen besteht nachweislich seit der Bronzezeit (Şahoğlu 2005). Schlangen werden seit der Antike für okkulte Rituale verwendet (z.B. Bauchot 1998) und gezielt dafür gesammelt. Außerdem wurden sie, in Tongefäßen verpackt, bei Seeschlachten als Wurfgeschosse verwendet, um auf den feindlichen Schiffen Verwirrung zu stiften (Mayor 2008).

So zeigten genetische Analysen, dass die vermeintlich seltenste Schlange Europas (Böhme 2005) (*Hierophis gyarusensis*) von der Kykladeninsel Gyaros vermutlich keinen autochthonen Ursprung hat und eine extraterritoriale Population von *Hierophis viridiflavus* ist (Utiger & Schätti 2004). Mindestens drei weitere Arten haben im Mittelmeerraum vom Seehandel profitiert und ihr Areal durch Verschleppung ausgeweitet. So wurden *Hemidactylus turcicus* und *Chalcides ocellatus* (Lymberakis & Poulakakis 2010) sowie *Natrix maura* (Guicking et al. 2005) und *Malpolon monspessulanus* (Álvarez et al. 2010) nachweislich durch den Menschen verschleppt.

Wesentlich älter sind die Knoten der festländischen Unterarten, insbesondere die der bisher unbeschriebenen südiranischen Levanteotter, die sich in einem Zeitfenster zwischen 5,1-7,5 Mio. Jahren von den übrigen Linien trennte. Bei der neu entdeckten Linie handelt es sich wahrscheinlich um den direkten Ahnen einer gemeinsamen *Macrovipera*-Stammart (Stümpel & Joger 2009).

Die Divergenzen innerhalb der Bergottern (*Montivipera*) repräsentieren alte separate Linien, mit distinkter biogeographischer Geschichte, die durch lange Zeiträume der genetischen Isolation bedingt sind.

Die Trennung der Bergottern in eine west- und ostanatolische-Gruppe lässt sich zeitlich mit zwei markanten tektonischen Ereignissen in Verbindung bringen, der Anhebung des türkisch-iranischen Plateaus und der Bildung des „Isparta-Angle“. Die tektonischen

Prozesse werden von Facenna et al. (2006) und Şapaş & Boztepe-Güney (2009) geschildert.

Durch die Nordwärtsdrift der arabischen Platte wird die anatolische Mikroplatte, eingeklemmt zwischen eurasischer Platte im Norden und afrikanischer Platte im Süden, zu einer Ausweichbewegung nach Westen gezwungen. Der Vorstoß der arabischen Platte führt zur Deformation entlang des Bitlis-Pontischen Gürtels (anatolische Diagonale<sup>6</sup>) sowie zur Ausdehnung der ägäischen Region. Anatolien bewegt sich mit 22 mm pro Jahr gen Westen. Der Vorschub erzeugt Reibungen und Spannungen zwischen anatolischer und eurasischer Platte entlang der nordanatolischen Faltungszone (NAF) und zum Aufwurf des pontischen Gebirges. Die tektonischen Prozesse haben im späten Miozän-Pliozän zur Anhebung des anatolisch-iranischen Plateaus um 1,5 bis 2 km geführt. Die damit verbundene Veränderung der Regionalklimate hat das ökologische Verhalten der Organismen nachhaltig beeinflusst. Durch den adiabatischen Temperaturgradienten sinkt die Lufttemperatur mit steigender Höhe um 0,6 - 1°C pro 100 m.

Das Zusammenwirken von zwei tektonischen Prozessen hat zur Aufspaltung der Bergotterpopulationen geführt. Die Anhebung der anatolisch-iranischen Platte veränderte die ökologischen Parameter, während der „Isparta-Angle“ die räumliche Isolation (Vikarianz) der Populationen herbeiführte. Der „Isparta-Angle“ ist eine bedeutende geomorphologische Deformation der östlichen Mittelmeerregion. Sie teilt Anatolien in eine westliche und östliche Deformationsregion (Reilinger et al. 1997). Die trianguläre Reliefform erstreckt sich über 120 km in der Länge und 50 km in der Breite und teilt den Taurus in Nord-Süd-Richtung. Während der tektonischen Evolution vom Beginn des späten Miozäns bis zum Pliozän wurde die westliche Flanke (Bey Dağları) zur heutigen Antikline aufgewölbt und um 20° gegenurzeigerlich gedreht (van Hinsbergen et al. 2010). In seinem Zentrum entstand ein Grabensystem, das Anatolien in einen Ägäischen Block (30 mm/Jahr) und einen Zentralanatolischen Block (20 mm/Jahr) unterteilt, die beide mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten westwärts driften (McClusky et al. 2000). Der „Isparta-Angle“ ist eine zoogeographische Barriere. Bergotterpopulationen westlich und östlich der Formation bilden jeweils monophyletische Kladen, deren MRCA vor ca. 5,4 Mio. Jahren getrennt wurde.

Deutlich jünger als die *xanthina*-Linien sind die Arten *Montivipera bornmuelleri*, *M. wagneri*, *M. bulgardaghica* und *M. albizona*. Zwei der Linien lassen sich auch hier mit geologischen Ereignissen korrelieren. *Montivipera bornmuelleri* wurde vor 2,8 Mio. Jahren von den nächst verwandten Arten separiert. Sie ist ein Endemit der libanesisch-syrischen Hochgebirge (Nilson & Andrén 1986a). Im späten Pliozän (vor 3,4 bis 1,8 Mio. Jahren) war die gesamte

---

<sup>6</sup> Die anatolische Diagonale entspricht der zentralanatolischen Faltungszone (siehe Koçyiğit & Özacar 2003)

Levante, mit den heutigen Gebieten Sinai, Israel, Libanon, eine Insel, die zum Osten durch eine flache Meeresstraße vom Festland getrennt war (Popov et al. 2004).

Die Wechsel von Kalt- und Warmzeiten im Pleistozän haben weltweit zu Verschiebungen von Klimazonen geführt, in deren Folge es zu Aussterbeereignissen und Arealveränderungen der Biota kam. Der Beginn des Pleistozäns (Gelasium) ist durch mehrere Kaltphasen gekennzeichnet (z.B. Ruddiman 2006), die möglicherweise die relikthartige Verbreitung von *M. wagneri* erklären könnten. *M. wagneri* spaltete sich vor 1,8 Mio. Jahren von der Schwestergruppe ab. Die pleistozänen alpinen und subalpinen Gebirgslagen des anatolischen Plateaus waren für poikilotherme Arten nur bis zu einer bestimmten Höhenzone bewohnbar. Die heutige vertikale Arealgrenze liegt im Vorderen Orient etwa bei 2800 m ü NN und in pleistozänen Kaltzeiten entsprechend niedriger. Im frühen Pleistozän entsprach das Klima in Armenien dem des heutigen Kaukasus und gewährleistete eine differenzierte, mosaikartige Vegetation, mit warm-feuchten und trocken-kontinentalen Anteilen (Joannin et al. 2010). Das Hauptverbreitungsgebiet der Wagners-Bergotter beschränkt sich auf das ostanatolische Aras-Tal im armenischen Grenzgebiet zwischen 1600 und 2200 m ü NN. Der Aras-Fluss ist ein Bindeglied zwischen den Hochgebirgen Ostanatoliens und den pleistozänen Refugialräumen im armenischen Tiefland. Mit Beginn des Pleistozäns vor 2,6 Mio. Jahren wurde das Areal der Wagners-Bergotter vermutlich fragmentiert und nur die Populationen des Aras-Tales konnten in die wärmeren Refugialräume ausweichen.

Das Pleistozän war für die Arealausdehnung eurasischer Squamaten von entscheidender Bedeutung (z.B. Joger et al. 2007). Insgesamt 42 Glazial-Interglazial-Zyklen (z.B. Leroy et al. im Druck) haben über einen Zeitraum von 2,6 Mio. Jahren Ausdehnung und Gestalt der Lebensräume beeinflusst und damit die genetische Architektur rezenter Haplotypenmuster geprägt (Avice 2004). Der Blick auf das Chronogramm (Abbildung 23) zeigt, dass gleich eine ganze Reihe von Splits auf einen Zeitraum zwischen 1,8 bis 2,0 Mio. Jahren datiert sind. Das betrifft die Knoten: *Vipera ebneri* vs. *Vipera renardi* (1,82 Mio. Jahre), *Vipera ursinii macrops* vs. *Vipera ursinii ursinii* (2,08 Mio. Jahre), *Vipera berus bosniensis* vs. *Vipera barani* (1,81 Mio. Jahre) *Montivipera wagneri* vs. *Montivipera bulgardaghica* (1,84 Mio. Jahre) und *Montivipera latifii* vs. *Montivipera raddei* (2,07 Mio. Jahre).

Nicht alle Kaltzeiten hatten die gleiche Intensität und Dauer (z.B. Ruddiman 2006). In Abhängigkeit von Breiten-, Höhenlage und organischer Toleranz waren Squamaten unterschiedlich stark betroffen. In Regionen, in denen Squamaten am Rande ihrer ökologischen Toleranz lebten (Arealrandlagen), haben Kaltzeiten zur Extinktion geführt, während sie in klimatisch begünstigten Regionen überdauern konnten.

Innerhalb der Gattung *Vipera* (s.l.) zeigt sich eine hohe genetische und chronologische Struktur. Die Aufspaltung in die drei Linien *ammodytes*, *aspis/latastei* und *Pelias* erfolgte äquivalent zu der Trennung von *Macro-* und *Montivipera* vor ca. 14 Mio. Jahren. Die Stammart von *Vipera ammodytes* hat zu diesem Zeitpunkt den Balkan besiedelt, der im Serravallium (siehe Abbildung 48) zwischen 14-13 Mio. Jahren als Insel in der Tethys vom übrigen europäischen Festland isoliert war (Popov et al. 2004). Die Radiation rezenter Haplotypen setzte erst im späten Pliozän vor 4,12 Mio. Jahren ein. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die Analysen von Ursenbacher et al. (2008). Die Autoren wiesen nach, dass die initiale Differenzierung zwischen den Kladen im Pliozän vor etwas mehr als 4 Mio. Jahren einsetzte.

Die Trennung von der *berus*- und *aspis*-Gruppe lässt sich mit keinem geologischen Ereignis korrelieren.

Barbanera et al. (2009) untersuchten die Phylogeographie von *Vipera aspis* und datierten den MRCA rezenter Haplotypen auf 1,25 Mio. Jahre. Ihrer Analyse liegt jedoch nur ein Kalibrierungspunkt amerikanischer Lanzenottern zugrunde. Die hier berechnete Divergenzzeit zwischen *Vipera aspis francisciredi* vs. *Vipera aspis hugyi* ist deutlich älter und liegt bei 2,8 Mio. Jahren.

Die Geburt und Verzweigung neuer Linien (Cladogenese) ist ein konstanter Prozess der Evolution. Je mehr Zeit vergeht, desto mehr neue Zweige entstehen in einem Stammbaum. Dieser Vorgang wird als „Birth“-Prozess bezeichnet. Fossilüberlieferungen beweisen jedoch, dass Linien nicht nur neu entstehen, sondern auch aussterben (Birth-death-Prozess). Die Geburt und der Tod von Linien in einem Stammbaum vollziehen sich mit konstanten Raten (Barracough & Nee 2001, Nee 2006). In einem Chronogramm nimmt die Anzahl der Verzweigungen (Linien) kumulativ zu und steigt vor Erreichen des Zeitpunktes Null asymptotisch an. Dieser Verlauf kennzeichnet den Birth-death-Prozess (Nee 2006).

Gleich mehrere Linien des Chronogramms (Abbildung 23) zeigen jedoch einen anderen, untypischen Verlauf. Den Linien *raddei* (existent seit 9,5 Mio. Jahren), *ammodytes* (existent seit 14,6 Mio. Jahren) sowie *mauritanica* und *palaestinae* (existent seit 10 Mio. Jahren) fehlen basale Verzweigungen. Dafür gibt es zwei Erklärungen. Wiederholt haben Aussterbeereignisse dazu geführt, dass Schwesterlinien verschwunden sind und nur ein Teil der Stammart – im Sinne eines „Bottle-neck oder “Founder-effect“ – überlebt hat. Alternativ könnte die Stammart in hohen Populationsdichten ein relativ kleines Areal besiedelt haben. Das Fehlen vikariierender Ereignisse reduziert die Wahrscheinlichkeit der Abspaltung neuer Haplotypen und permanenter Genfluss hat potentielle „Ausreißer“ nicht entkommen lassen.

---

Ein ähnliches Bild zeigen die Linien *Cerastes*, *Eristicophis* und *Pseudocerastes*, die jedoch wegen eines zu geringen Probenumfanges (*Eristicophis* und *Pseudocerastes*) bzw. fehlender mt-Sequenzen (*Cerastes*) reduzierte Aussagekraft haben.

## 7 Phylogenie orientalischer Viperiden der Gattungen *Macrovipera*, *Montivipera*, *Daboia*, *Eristicophis* und *Pseudocerastes*

### 7.1 Einleitung

In der europäischen Herpetofauna weckt kaum eine andere Artengruppe unter Wissenschaftlern und Terrarianern ähnlich viel Aufmerksamkeit wie die der Giftschlangen (Obst 1982). Dementsprechend groß ist die literarische Tradition (z.B. Schwarz 1936, Psenner 1940, Joger 1984, Bruno 1985, Brodmann 1987, De Smedt 2001, Mallow et al. 2003, Joger & Stümpel 2005c, Phelps 2010, vergleiche auch Kapitel 5).

Traditionell kann die europäische Herpetofauna auf eine längere und intensivere Erforschungsgeschichte zurückblicken als die Herpetofauna des Vorderen und Mittleren Orients. Obgleich sich namhafte Herpetologen mit der Taxonomie und Systematik orientalischer Vipern beschäftigten (z.B. Schwarz 1936, Mertens et al. 1967, Obst 1982, Nilson & Andrén 1986a, Herrmann et al. 1992a,b), blieben ihre systematischen Hypothesen strittig und wurden kontrovers diskutiert.

Bis in die achtziger Jahre des 20sten Jahrhunderts wurden paläarktische Viperinae, ausgenommen *Eristicophis*, *Pseudocerastes*, *Echis* und *Cerastes*, unter der Gattung *Vipera* sensu Laurenti (1768) vereint (z.B. Schwarz 1936, Mertens & Wermuth 1960). Einen ausführlichen Überblick zur Entwicklung der historischen Taxonomie geben auch Herrmann et al. (1992b). Saint Girons (1978) unterschied ohne nomenklatorische Relevanz noch sehr undifferenziert die drei Gruppen *russelii*, *lebetina* und kleine europäische Vipern. Obst (1982) führte den Namen *Rhinaspis* Bonaparte, 1834 für die Arten *aspis-ammodytes-latastei* ein und trennte sie damit nomenklatorisch von *berus-ursinii* (*Vipera* Laurenti, 1768) ab. Alle übrigen paläarktischen Viperinae – mit Ausnahme von *Eristicophis*, *Cerastes* und *Echis* – vereinte er unter der Gattung *Daboia* Gray, 1842. Trotz auffallend ökologisch und morphologisch abweichender Merkmale synonymisierte er *Pseudocerastes persicus* (*persica*) Boulenger, 1896 mit *Daboia*. Joger (1984) befürwortet die Abtrennung der großen orientalischen Vipern (*lebetina* und *russelii*) von *Vipera*, lehnt die Einbeziehung des *Montivipera xanthina*-Komplexes und *Pseudocerastes* jedoch zu Recht ab.

Neue Erkenntnisse wurden mithilfe der molekularen Phylogenetik gewonnen. So wurden auf Basis von Blutserum-Analysen die asiatischen und nordafrikanischen Taxa der *lebetina*- und *mauritanica*-Komplexe in einer eigenen Gattung *Macrovipera* Reuss, 1927 zusammengefasst (Herrmann et al. 1992b). Herrmann et al. (1999) und Lenk et al. (2001) rekonstruierten erstmals die Stammesgeschichte der Viperinae auf Grundlage von Gensequenzen, die zu nomenklatorisch taxonomischen Umstrukturierungen führten. Die



Genstammbäume von Lenk et al. (2001) bestätigten jedoch nicht die unmittelbare Verwandtschaft von *lebetina* (s.l.) und *mauritana* (s.l.), sodass *Macrovipera* auf *lebetina* restringiert wurde und *russellii*, *palaestinae* und *mauritana* (s.l.) unter *Daboia* vereint wurden (Lenk et al. 2001). Darüber hinaus wurde *Vipera* nach traditioneller Klassifizierung paraphyletisch (Hermman et al. 1999, Lenk et al. 2001) und es entstand die Notwendigkeit, *Vipera* aufzutrennen. Nilson et al. führten 1999 den Namen *Montivipera* für die orientalischen Bergottern ein, dem später Gattungsstatus zuerkannt wurde (Joger 2005).

Wenngleich der Datensatz von Lenk et al. (2001) nur wenige repräsentative orientalische Vipern umfasste (12 OTUs), wurde die Monophylie von *Montivipera*, *Macrovipera*, *Daboia* und *Eristicophis/Pseudocerastes* bestätigt. Allerdings sind die phylogenetischen Beziehungen der Subkladen statistisch nicht abgesichert. Auch Garrigues et al. (2005) scheiterten an dem Versuch, die Stammesgeschichte der Gattungen aufzuklären. Die Autoren konnten lediglich die Monophylie der Schwestertaxa *Monti-* und *Macrovipera* nachweisen.

Neben den Gattungen *Daboia*, *Eristicophis* und *Pseudocerastes* stehen in diesem Kapitel insbesondere die Gattungen *Montivipera* und *Macrovipera* im Brennpunkt des Interesses. Beide Gattungen umfassen mindestens 18 nominelle Taxa, deren Taxonomie und Systematik sehr kontrovers und zuweilen emotional diskutiert wurden (siehe Nilson & Andrén 1992, Schätti et al. 1992). Im Fall der Bergottern stehen sich zwei taxonomisch antagonistische Auffassungen gegenüber, denen andere Autoren mehr oder weniger subjektiv folgen (z.B. David & Ineich 1999). Wüster et al. (1997) stellen daher fest: "Until a full analysis of the population phylogeny of these forms is carried out, using large samples and preferably a wide range of characters, and in particular molecular markers, the situation is likely to remain confused." (S.335).

Die Bergottern sind mit neun endemischen Taxa im Vorderen Orient verbreitet. Nach der vorherrschenden Meinung werden mit *M. raddei* und *M. xanthina* zwei Art-Komplexe unterschieden, die zoogeographisch voneinander getrennt sind. Die anatolischen Bergottern (*xanthina*-Komplex) bewohnen Thrakien, Kleinasien und die Levante (Nilson & Andrén 1986a, Joger 1984, Stümpel & Joger 2009). Ihr östliches Pendant ist der *raddei*-Spezies-Komplex, der in Armenien, Aserbaidschan, Nachitschewan, Iran, Ost-Türkei und vermutlich in Nordost-Irak verbreitet ist (Nilson & Andrén 1986a, Joger 1984, Stümpel & Joger 2009).

Die nominellen Taxa der beiden Art-Komplexe haben eine sehr junge Erforschungsgeschichte. Mehr als 50% der Taxa wurden in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts von den schwedischen Zoologen Nilson & Andrén (1984, 1985a,b, 1986a) und Nilson et al. (1990) entdeckt und beschrieben. Trotz der taxonomisch unklaren Situation

stuft die IUCN (<http://www.iucnredlist.org>) *albizona*, *bornmuelleri* und *latifii* als gefährdet, *raddei* als nahezu gefährdet und *wagneri* als kritisch gefährdet ein (Stand 4.2010).

Die Levanteottern der Gattung *Macrovipera* bewohnen die Steppengebiete Vorderasiens (Jordanien, Syrien, Türkei, Irak, Iran, Aserbaidschan) bis nach Mittelasien (Turkmenistan, Usbekistan, Tadschikistan, Kirgistan, Kasachstan, Afghanistan) und Südasien (Pakistan, Indien) (Joger 1984, Bruno 1985, Mallow et al. 2003). Zwei Exklaven außerhalb des Verbreitungsgebietes sind die Vorkommen auf den griechischen Kykladen (Schweizer 1931, Nilson 2005) sowie in Nordafrika (Nilson & Andrén 1988).

Gemeinsam mit *Echis* ist *Macrovipera* im Vorderen Orient und Mittelasien für die Mehrzahl schwerwiegender bis tödlicher Vergiftungsunfälle verantwortlich (Fatehi-Hassanabad & Fatehi 2004). Nichtsdestotrotz gibt es auch in der medizinisch epidemiologisch wichtigen Gruppe keinen taxonomischen Konsens. Joger (1984) folgt der Auffassung von Mertens (1951) und akzeptiert neben der Nominatform von der Insel Zypern nur die Unterart *obtusa*. Alle anderen Taxa fasst er als Synonyme von *obtusa* auf. Billing & Schätti (1984) erkennen neben *lebetina* und *obtusa* noch die Unterarten *turanica* und *schweizeri* als valide an, während sie den Status von *euphratica* bezweifeln. Nilson & Andrén (1988) erheben die Populationen der Kykladen in den Rang einer eigenen Art und 1992 beschreiben Chikin & Szczerbak mittelasische Populationen vom Murghab Fluss als neue Unterart *cernovi*. Eine notwendige und durch Billing & Schätti (1984) angekündigte Revision der Gruppe wurde nicht realisiert.

Ziel der Untersuchungen ist es, die kontroverse Debatte über die Systematik der Arten auf Basis eines umfassenden Taxon- und Sequenz-Datensatzes mit neuen Fakten zu versachlichen und die Basis für eine dringend notwendige Revision der Gruppe, wie von Wüster et al. (1997) gefordert, zu liefern.

Ein umfassendes Proben-Sampling von mehr als 175 OTUs war die Grundlage für die Generierung eines mt-Sequenzdatensatzes (Cytb, COI, ND5), der für die Beantwortung der folgenden Fragen genutzt wurde:

- 1) Wie sind die phyletischen Beziehungen zwischen den Taxa *bornmuelleri*, *wagneri*, *bulgardaghica* und *albizona*, und sind die genannten Taxa conspezifisch mit *xanthina*, wie von Schätti et al. (1990) vermutet?
- 2) Repräsentieren *Montivipera albicornuta*, *M. latifii* und *M. raddei* getrennte evolutionäre Linien?
- 3) Gibt es innerhalb von *Macrovipera lebetina* eine nennenswerte phyletische Struktur und ist diese konkordant mit der gegenwärtigen Taxonomie?

4) Sind die Gattungen *Montivipera*, *Macrovipera*, *Daboia*, *Pseudocerastes* und *Eristicophis* monophyletische Gruppen, wie von Lenk et al. (2001) postuliert, und wie sind ihre stammesgeschichtlichen Beziehungen zueinander?

## 7.2 Ergebnisse

### 7.2.1 Sequenz- und Sättigungsanalyse

Der konkatenierte Datensatz mit 175 OTUs enthält 2566 Alignmentpositionen (1062 bp Cytb, 902 bp COI, 602 bp ND5) mit 1352 konstanten Variablen, 134 uninformativen Merkmalen und 1080 Parsimonie-informativen Merkmalen. Die Sequenzen der Gene Cytb und COI enthalten keine Indels oder Frameshifts. Proben von *Daboia russelii* und *D. siamensis* enthalten eine 9 bp lange Deletion in dem Gen ND5. Im Übergang der t-RNA Leucin zu ND5 existiert bei den Taxa *Bitis*, *Eristicophis*, *D. russelii*, *D. siamensis*, *Pseudocerastes*, ein Frameshift, der als Baseninsertion erkennbar ist.

Sättigungseffekte wurden getrennt für die untersuchten Gene und Codonpositionen untersucht. Abbildung 24 zeigt das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen, aufgetragen gegen die korrigierte genetische Jukes-Cantor-Distanz. Die Sequenzen von Cytb, COI, ND5 zeigen unter dem Jukes-Cantor-Modell zur Distanzkorrektur in keiner Codonposition Sättigungseffekte.

Die graphischen Ergebnisse der Sättigungsanalyse werden auch von dem „Information entropy-based index“ untermauert. Für die untersuchten mt-Gene wurden in den ersten beiden Codonpositionen keine Sättigungseffekte festgestellt ( $I_{ss} < I_{ss.c}$ ,  $p < 0,001$ , für 4, 8, 16, 32 OTUs). Für die dritte Codonposition zeigt der „Information-entropy-based-index“ Tendenz zur Sättigung. Der resultierende  $I_{ss}$ -Wert ist für die protein-codierenden Gene signifikant ( $p < 0,001$ ) kleiner als der  $I_{ss.cSym}$ . Im Fall des 32 OTU-Subsets sind die dritten Codonpositionen asymmetrischer Topologien tendenziell gesättigt. Der  $I_{ss.aSym}$  ist hier stets marginal kleiner als der  $I_{ss}$  (Cytb  $I_{ss} = 0,385$ ,  $I_{ss.aSym} = 0,303$ ,  $p = 0,055$ ; COI  $I_{ss} = 0,373$ ,  $I_{ss.aSym} = 0,335$ ,  $p = 0,16$ ; ND5  $I_{ss} = 0,332$ ,  $I_{ss.aSym} = 0,319$ ,  $p = 0,74$ ).

Die Testergebnisse zeigen, dass die dritte Codonposition der mt-Gene ein brauchbares Signal liefert, wenn die Phylogenie nicht stark asymmetrisch ist. Die dritte Codonposition wurde daher von den phylogenetischen Analysen nicht ausgeschlossen.

Das geeignetste Modell zur Sequenzevolution ist nach dem Akaike Information Criterion (AIC) das General-Time-Reversible-Modell GTR+I+G (Tavare 1986, Yang 1994) mit Ratenunterschieden zwischen Alignmentpositionen (I = Anteil invariabler Positionen, G = Gamma-Verteilung).

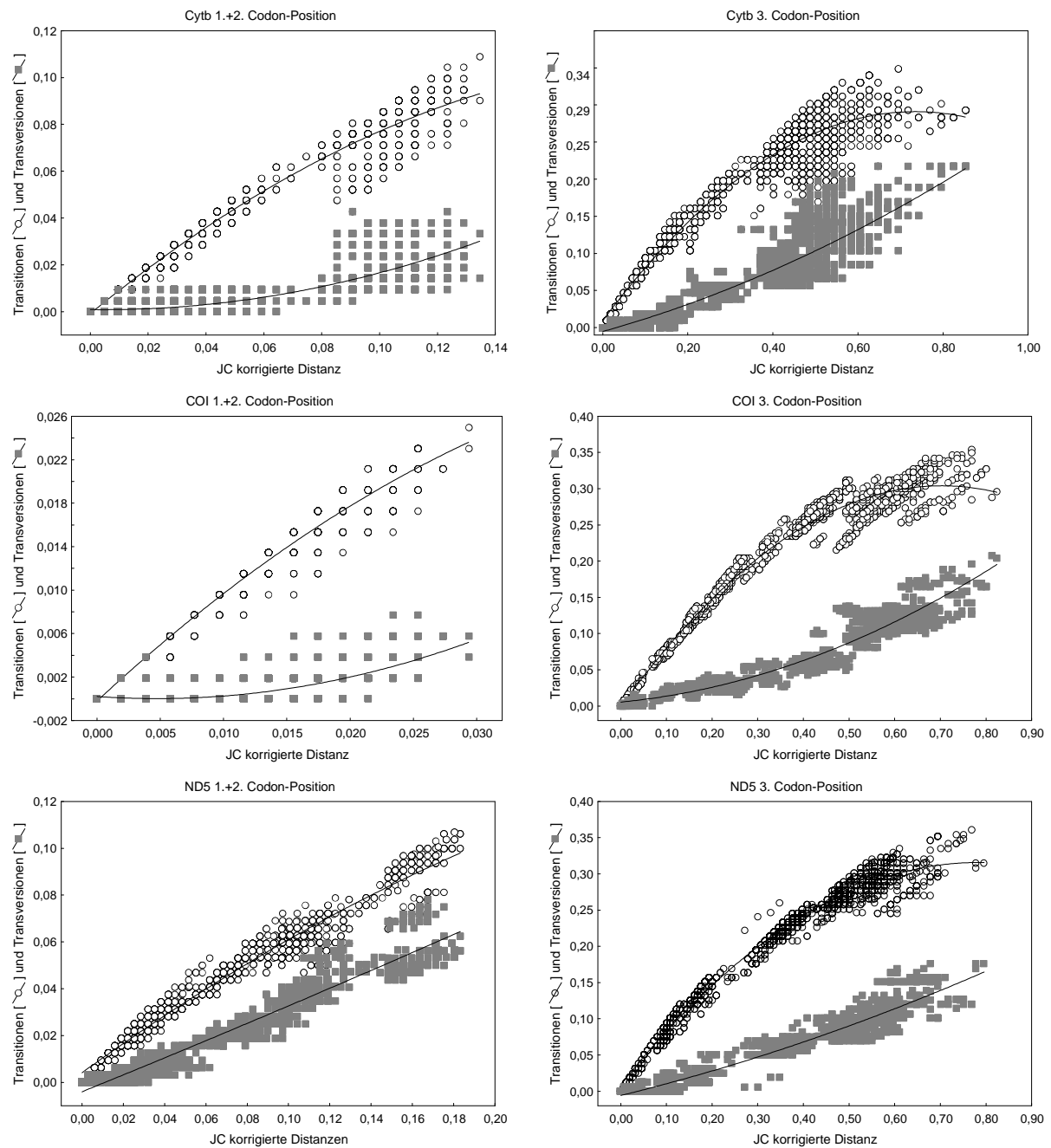


Abbildung 24 Graphische Sättigungsanalyse generiert mit DAMBE (Xia & Xie 2001) für die untersuchten mt-Gene Cytb, COI und ND5 (Datensatz 2566). Die Anzahl beobachteter Transitionen (Ts) und Transversionen (Tv) sind gegen die korrigierte genetische Jukes-Cantor (JC) Distanz der paarweise verglichenen Sequenzen aufgetragen. Linke Seite: Beobachtete Ts und Tv für die erste und zweite Codonposition. Rechte Seite: Beobachtete Ts und Tv für die dritte Codonposition. Sättigung ist erreicht, wenn mit ansteigender genetischer Distanz Tv gleichhäufig oder häufiger als Ts stattfinden. Bei codierenden Genen tritt die Sättigung zuerst für die schnell evolvierende dritte Codonposition ein.

### 7.2.2 Phylogenie

Die Bayesian Inferenz und Maximum-Likelihood-Bäume (Abbildung 25 bis Abbildung 28) sind vollständig aufgelöst und ihre Knoten sind statistisch durch robuste Posterior-Probabilities ( $\bar{x} = 0,99$ ) und Bootstrap-Werte ( $\bar{x} = 96$ ) abgesichert.

Die Topologie des Baumes zeigt mehrere distinkte Kladen, die die aktuelle taxonomische Systematik eurasischer Viperinae auf Gattungsebene repräsentieren. Die wesentlichen Kladen der Innengruppe sind *Bitis*, *Vipera*, *Eristicophis/Pseudocerastes*, *Daboia*, *Monti-* und *Macrovipera*. *Bitis* ist die Schwestergruppe der eurasischen Viperinae. Der gemeinsame Knoten ist durch maximale Posterior-Probabilities und Bootstrap-Werte sicher gestützt. Die kleinen Arten der Gattung *Vipera* bilden einen basalen Zweig, der den Großvipern Asiens gegenüber steht. Die statistische Verlässlichkeit, dass *Vipera* einen gemeinsamen Vorfahren hatte, ist für BI und ML durch maximale Werte untermauert. Für die Innengruppe von *Vipera* lassen die Posterior Probability und Bootstrap-Werte der BI- und ML-Analysen alternative Topologien zu. In 93% der BI- und 86% der ML-Bäume gehen die asiatischen Vipern auf einen gemeinsamen Stammlinienvertreter zurück. Noch geringer ist die statistische Unterstützung für den gemeinsamen Vorfahren von *Daboia*, *Macrovipera* und *Montivipera*. Das Schwesterverhältnis von *Daboia* zu *Macro-* und *Montivipera* wird nur durch PP von 0,82 und 63% Bootstrap gestützt.

Die Wüsten und Halbwüsten bewohnenden Gattungen *Eristicophis* und *Pseudocerastes* bilden einen gemeinsamen Zweig. *Eristicophis* ist eine monotypische Gattung, während *Pseudocerastes* je nach taxonomischer Auffassung bis zu vier Arten umfasst. Die genetische Distanz zwischen *P. persicus* aus Jordanien und *P. fieldii* vom Sinai ist allerdings sehr gering ( $p = 0,002$ ). Proben der erst jüngst beschriebenen Art *urachnoides* Bostanchi et al., 2006 sowie *bicornis* waren nicht verfügbar.

Weit verbreitet ist die Gattung *Daboia*. Von der subtropischen Atlantikküste Nordafrikas bis in die tropischen Klimazonen der Insel Java und Taiwan bewohnt die Gattung ein disjunktes Areal. Vier distinkte evolutionäre Linien sind erkennbar. Kettenvipern aus Südostasien sind trotz ihrer morphologischen Ähnlichkeit in zwei Arten *Daboia russelii* und *D. siamensis* gesplittet ( $p = 0,106$ ). *Daboia palaestinae* bewohnt ein kleines Areal entlang der Levante. Die untersuchten Proben sind wenig variabel aber deutlich von der Schwesterart *mauritanica* aus Afrika verschieden ( $p = 0,125$ ). Die unkorrigierte genetische Distanz der beiden Taxa *mauritanica* und *deserti*, die je nach taxonomischer Auffassung als Subspezies oder Spezies betrachtet werden, beträgt nur  $p = 0,012$ .

Die beiden Gattungen *Macro-* und *Montivipera*, die vom Vorderen Orient bis nach Mittelasien verbreitet sind, stehen im besonderen Fokus der vorliegenden Arbeit. Sie sind zahlenmäßig im Probenumfang höher vertreten als andere Gruppen.

Bergottern der Gattung *Montivipera* bilden zwei geographisch und genetisch deutlich distinkte Kladen (*raddei*-Komplex und *xanthina*-Komplex).

Der *raddei*-Komplex (Abbildung 25) ist eine evolutionsgeschichtlich junge Radiation mit einer maximalen genetischen Distanz von  $p = 0,025$ . Die gegenwärtige taxonomische Gliederung des *raddei*-Komplexes in drei Arten und zwei Unterarten ist nicht mit der Struktur des Baumes konkordant. Haplotypen von *M. latifii* sind klar von *M. raddei* (s.l.) getrennt. Die Schwestergruppe von *M. latifii* ist durch eine Tritomie gekennzeichnet. Haplotypen von *albicornuta* sind nicht monophyletisch und auf unterschiedliche Äste des Baumes zerstreut. *Montivipera albicornuta*- Proben aus dem Nordwesten Irans (Tekab, Sahand) sind geographisch und genetisch von Haplotypen aus Khān Shāy getrennt. *Montivipera raddei kurdistanica* von der Terra typica hat den gleichen Haplotyp wie die Nominatform *M. raddei raddei* und Proben aus dem türkischen Yüksekova, die zu *kurdistanica* gerechnet werden, bilden eine eigene Haplogruppe, die von *raddei* verschieden ist.

Das westliche Pendant zu der *raddei*-Spezies-Gruppe ist die *xanthina*-Spezies-Gruppe (Abbildung 26). Die Topologie des *xanthina*-Subzweiges gliedert sich in zwei symmetrische Zweige (west- und ostanatolische Gruppe) mit vergleichbarer genetischer Struktur. Die westanatolische Gruppe ( $p = 0,054$ ) hat bis dato taxonomisch wenig Beachtung gefunden und wird unter *xanthina* subsumiert. Die Position der Gruppe ist allerdings statistisch nicht abgesichert, wenngleich ihre Subzweige robuste Posterior-Probabilities und Bootstrap-Werte aufweisen. Das Verzweigungsmuster der westanatolischen Gruppe lässt eine Aufspaltung in Ost-West-Richtung erkennen. Die Haplogruppe mit der östlichsten Verbreitung (Taurus) steht basal gefolgt von einem Ast aus Lykien, der geographisch als auch topologisch intermediär positioniert ist. Die dritte Haplogruppe ist im ägäischen Raum verbreitet und gliedert sich in einen NW-ägäischen Zweig, der in Griechenland europäisches Festland und die Insel Lesbos erreicht. Der zweite Zweig ist geographisch auf die westtürkische Küste und die ihr vorgelagerten Inseln (Dodekanes) beschränkt. Im Norden des Areals überschreitet er das Marmarameer.

Die ostanatolische Gruppe ist mit vergleichbarer genetischer Struktur und genetischer Distanz ( $p = 0,040$ ) ein Multispezies-Komplex. Während die westanatolische Gruppe vom Meeresspiegel bis in die alpinen Höhenlagen vorkommt, sind die Spezies der ostanatolischen Gruppe ausschließlich auf Gebirgslagen oberhalb von 1200 m ü NN beschränkt. Der Spezies-Komplex besteht aus vier wesentlichen Haplogruppen, die durch robuste Posterior-Probabilities gestützt sind. *Montivipera bornmuelleri* ist der evolutionär älteste Zweig. Sein Verbreitungsgebiet beschränkt sich auf ein kleines Areal an der Levante. Populationen aus dem Nordlibanon sind genetisch von denen des Berges Hermon im Dreiländereck Israel, Syrien und Libanon verschieden ( $p = 0,01$ ). *Montivipera wagneri* aus

dem Einzugsgebiet des Flusses Ahras in Ostanatolien ist eine distinkte, aber sehr homogene Klade ohne genetische Struktur.

Die Schwestergruppe von *M. wagneri* bewohnt ein größeres Areal vom Taurus bis in die zentralantolischen Kumlaç Dağları. Haplotypen von *M. bulgardaghica* sind paraphyletisch und innerhalb *M. albizona* verschachtelt. *Montivipera bulgardaghica* Populationen aus dem Westtaurus bilden eine distinkte Klade.

Haplotypen von *Macrovipera lebetina* segregieren in mehrere Kladen, die konkordant mit der taxonomischen Klassifizierung sind. Die maximale genetische Distanz innerhalb *M. lebetina* beträgt  $p = 0,049$ . Die mediterranen Inselpopulationen (Kykladen, Zypern) der Levanteotter gehen auf eine gemeinsame Stammlinie zurück. Levanteottern von der türkischen Festlandsküste bei Mersin besitzen den gleichen Haplotyp wie die Populationen des 850 km entfernt liegenden Kykladenarchipels. Trotz der isolierten Inselverbreitung und der großen räumlichen Entfernung zwischen den Populationen beträgt ihre genetische Distanz nur 0,66%.

Die mediterranen Inselpopulationen sind die Schwestergruppe zu den festländisch verbreiteten Haplo-Gruppen. Ein gemeinsamer Ursprung festländischer Levanteottern wird nicht von allen Topologien gestützt (PP 0,91, BS 64). Unter ihnen zeichnen sich vier bis fünf divergente Kladen ab. Proben aus Armenien, Aserbaidschan, NW-Iran, und der Türkei gehören zu der Haplogruppe, die der Subspezies *obtusa* zugerechnet wird. Am Golf von Iskenderun ist der *obtusa*-Haplotyp sympatrisch neben einem weiteren Haplotyp vertreten, der mit der verkannten Subspezies *euphratica* assoziiert werden kann. Der Golf von Iskenderun ist demnach von zwei unterschiedlichen Subspezies kolonisiert worden. Die Schwestergruppe zu *obtusa* und *euphratica* sind die mittelasiatischen Levanteottern. Haplotypen von *M. l. turanica* sind geographisch auf die Länder Tadschikistan und Usbekistan nördlich der Flüsse Amudarja und Pjandž beschränkt. Haplotypen von *M. l. cernovi* sind von der chinesischen Grenze im Osten bis in die iranische Provinz Sabzevar verbreitet. Eine bis dato unbekannte endemische Population aus dem Südiran wurde als neue bisher unbeschriebene Art identifiziert. Sie repräsentiert möglicherweise eine anzestrale evolutionäre Linie, die ein geographisch eng begrenztes Gebiet bewohnt und keine weitere Radiation erfahren hat. Die Sequenzen haben eine maximale unkorrigierte genetische Distanz zu *lebetina* von 9,3%.

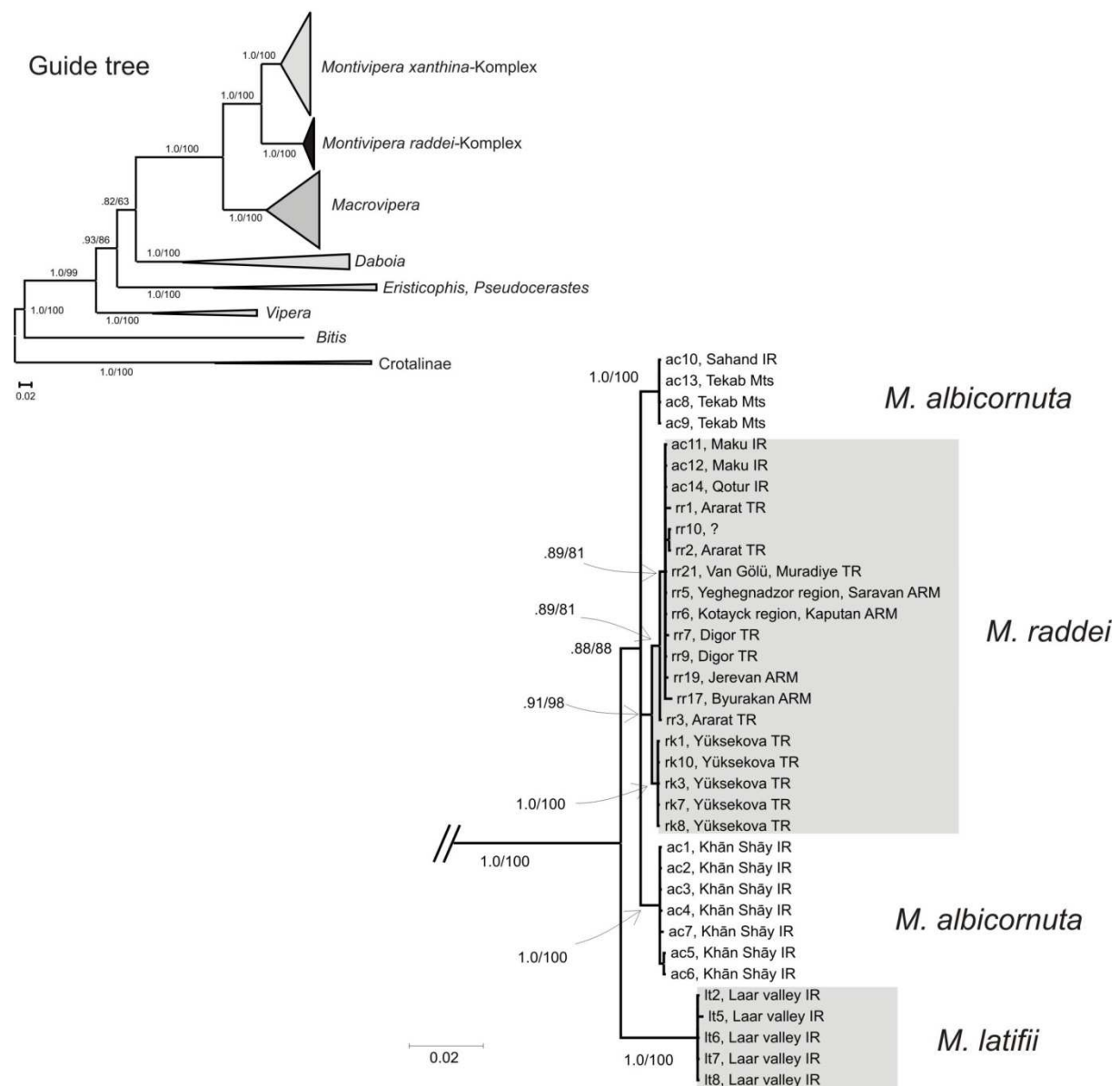
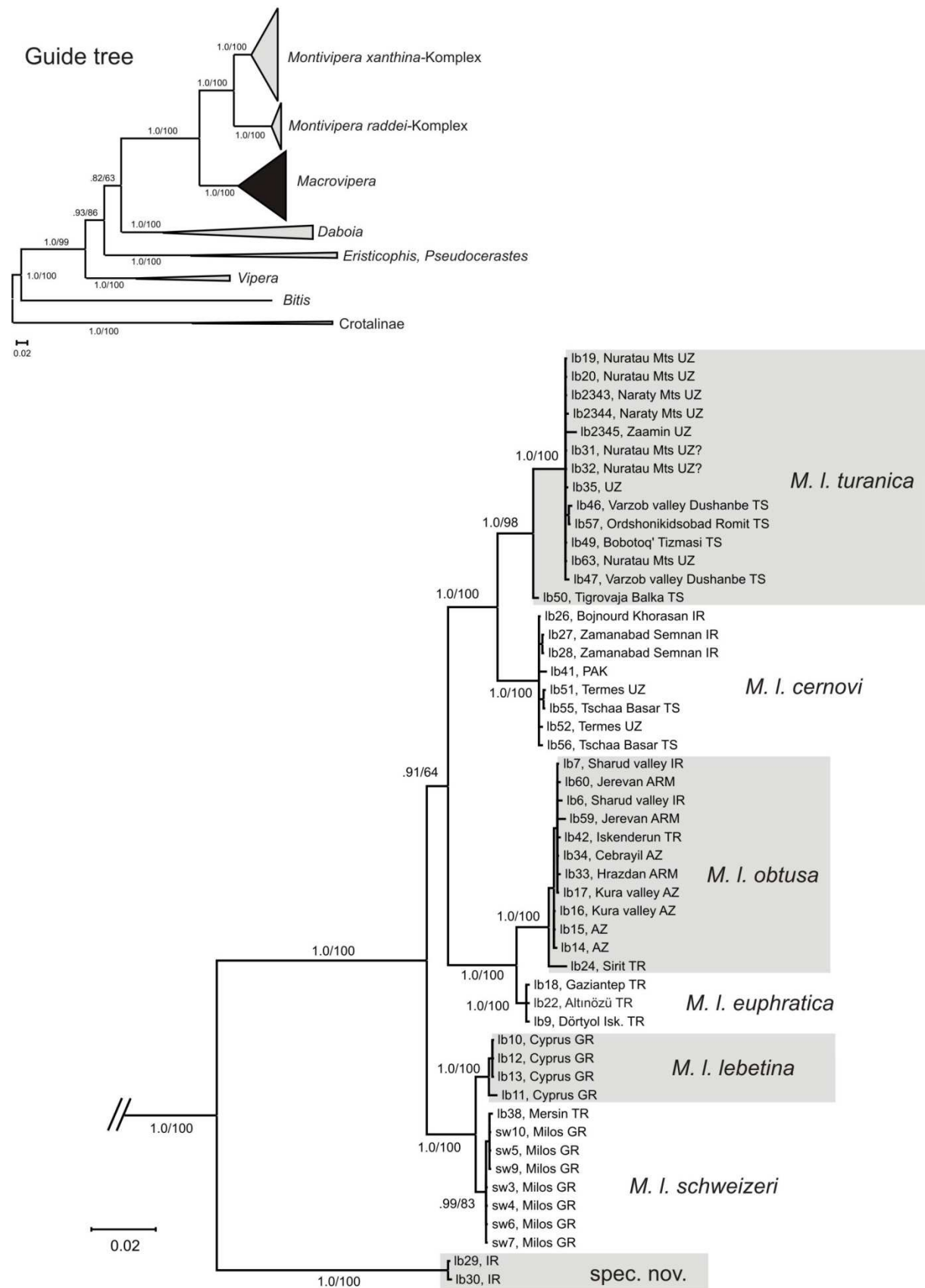


Abbildung 25: 50% majority rule Bayesian Inferenz (BI) Phylogramm orientalischer Viperiden - Subzweig *Montivipera raddei*-Komplex. Für die Analyse wurden Fragmente der drei mt-Gene Cytb, COX1, ND5 separat mit ClustalX (Larkin et al. 2007) aligniert und zu einem Supergen mit 2566 Alignmentpositionen verkettet. Der Datensatz (2566) umfasst 175 OTUs paläarktischer Viperinae, die mit der Unterfamilie Crotalinae gewurzelt wurden. Die Phylogenie wurde unter Verwendung des GTR+I+G Modells mit den Programmen MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003) und PHYML (Guindon & Gascuel 2003) rekonstruiert. Das Modell zur Sequenzevolution wurde mit dem Programm MrModeltest (Nylander 2004) nach dem hierarchischen Likelihood-Ratio-Test und dem Akaike Information Criterion geschätzt. Posterior-Probabilities der BI-Analyse und Bootstraps der ML-Analyse (1000 Replicates) sind angegeben. Für die BI-Analyse sammelten zwei unabhängige MC<sup>3</sup>-Analysen mit je zwei simultanen Läufen und vier Ketten für jeweils 3 Mio. Generationen jeden 100sten Baum. Die ersten 25% der 6 Mio. Bäume aus beiden Analysen wurden als Burnin verworfen und für die Berechnung des Konsensusbaumes nur Generationen der stabilen Phase herangezogen. Neben den in MrBayes implementierten Diagnosemöglichkeiten wurde die Konvergenz der Ketten zusätzlich mit dem Programm Tracer (Rambaut & Drummont 2007) überprüft.





Abbildung 27: Subzweig *Macrovipera*. Details zur Berechnung siehe Abbildung 25.

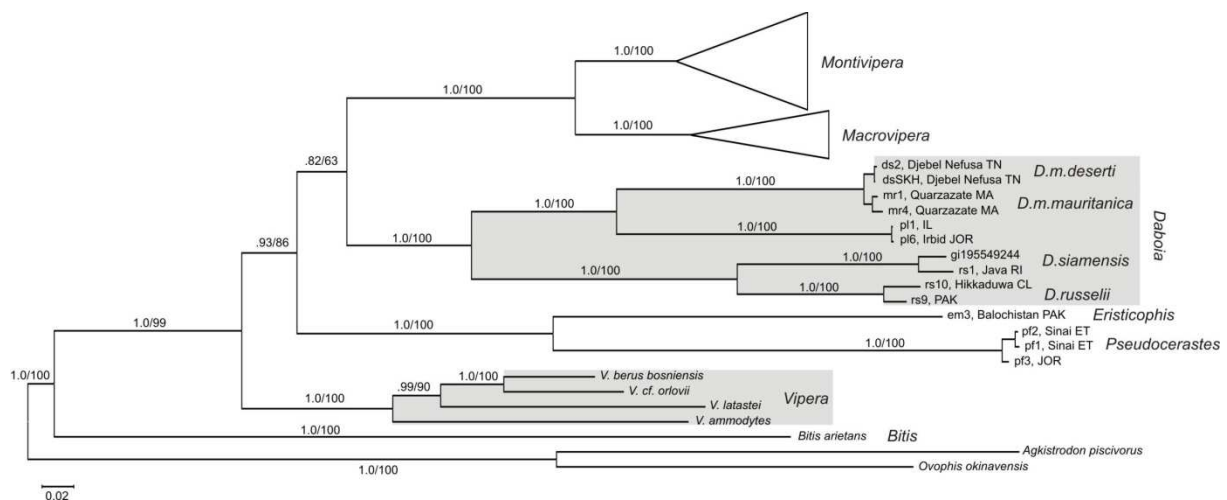


Abbildung 28: Subzweige *Daboia*, *Eristicophis*, *Pseudocerastes* und *Vipera*. Details zur Berechnung siehe Abbildung 25.

### 7.3 Diskussion

Den Stammbaumberechnungen der vorliegenden Arbeit liegt das bis dato umfassendste Datensampling orientalischer Vipern zugrunde. Die neuen statistisch robust abgesicherten Ergebnisse erlauben erstmals eine kritische Revision der gesamten Gruppe unter neuer Faktenlage.

Die Topographie der Großgruppenphylogenie zeigt nur bedingt Übereinstimmungen zu vorherigen Sequenzphylogenien von Lenk et al. (2001), Garrigues et al. (2005) und Wüster et al. (2008). Bereits Lenk et al. (2001) berechneten für die Schwesterbeziehung *Macrovipera*-*Montivipera* hohe statistische Unterstützungswerte, die von Garrigues et al. (2005) und Wüster et al. (2008) bestätigt wurden. Überraschenderweise zeigen die Stammbäume bestehender Publikationen untereinander und zu den hier gezeigten Phylogenien ein hohes Maß an Inkongruenz. In der hier gezeigten Phylogenie gehen orientalische Vipern mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück. In derselben Annahme führte Obst (1982) für die orientalischen Vipern den Namen *Daboia* ein, ohne dabei *Eristicophis* zu berücksichtigen. Groombridge (1986) lehnte den Namen *Daboia* wegen der obskuren phyletischen Beziehungen zu *Vipera*, *Pseudocerastes* und *Eristicophis* ab. Serumalbumin-Stammbäume führen *Daboia* sensu Obst (1982) auf einen polyphyletischen Ursprung zurück (Herrmann et al. 1992b). Lenk et al. 2001 restringierten *Daboia* auf die Arten *mauritanica*, *palaestinae*, *russelii* und *siamensis* (vergl. auch Wüster et al. 2008). Die vorliegende Phylogenie untermauert die von Lenk et al. (2001) vorgeschlagene nomenklatorische Einschränkung von *Daboia* auf die Taxa *mauritanica*, *palaestinae*, *russelii* und *siamensis*. Kramer & Schnurrenberger (1959) hatten bereits begründete Argumente, *mauritanica* und *deserti* von *lebetina* abzutrennen, die bis dato als

Unterarten von *lebetina* betrachtet wurden (z.B. Schwarz 1936, Mertens 1951). David & Ineich führten die Taxa von *Daboia* noch bis 1999 unter drei verschiedenen Gattungen, *russelii* (*Daboia*), *palaestinae* (*Vipera*), *mauritanica* und *deserti* (*Macrovipera*). Auch Mallow et al. (2003) vereinen die Arten noch nicht in einer Gattung, sondern belassen *mauritanica* unter *Macrovipera*, während sie den Namen *Daboia* für *russelii* und *palaestinae* akzeptieren. Die großen genetischen Distanzen zwischen der *mauritanica-palaestinae* Gruppe und der *russelii-siamensis* Klade ( $p=0,160$ ) sind geringer als zwischen den beiden Gattungen *Eristicophis* und *Pseudocerastes* ( $p=0,186$ ), dennoch aber größer als zwischen *Monti*- und *Macrovipera* ( $p=0,141$ ). Beide Artengruppen sind morphologisch und ökologisch deutlich verschieden. Während es sich bei *mauritanica* und *palaestinae* um ovipare Arten (Kratzer 1968) mit mediterraner Verbreitung (Joger 1984) und dormantem Winterstoffwechsel handelt, sind die ovoviviparen Arten *russelii* und *siamensis* hauptsächlich im subtropischen und tropischen Asien verbreitet (Trutnau 1998). Das Splitting der beiden Artengruppen in verschiedene Untergattungen oder Gattungen wäre eine konsequente Fortsetzung der taxonomischen Differenzierung orientalischer Vipern.

Bestehende Untersuchungen zur Phylogenie orientalischer Vipern sind durch Polytomien (Garrigues et al. 2005) oder niedrige statistische Unterstützungswerte (Lenk et al. 2001) der Knoten unpräzise und erlauben keine zuverlässige Rekonstruktion alter Stammlinien. In einer umfassenden Phylogenie der gesamten Familie der Viperidae von Wüster et al. (2008) sind die orientalischen Vipern mit sechs repräsentativen OTUs vertreten. In der genannten Arbeit sind orientalische Vipern jedoch nicht monophyletisch, weil *Vipera* die Schwesterklade zu *Daboia* bildet. Biogeographisch (siehe Kapitel 9) und morphologisch erscheint die gemeinsame Abstammung der beiden Linien ausgesprochen unrealistisch. Die Monophylie der beiden Gattungen ist möglicherweise ein „logarithmischer Artefakt“ des Programmes BEAST. Der genannte Knoten wird nur von BEAST als wahrscheinlich berechnet. Andere bayesianische Programme (MrBayes, PhyloBayes) stützen diesen Knoten nicht (siehe Kapitel 4 und 7).

Mit Ausnahme von morphologischen (Groombridge 1986) und Serum-Albumin basierten Stammbäumen (Herrmann et al. 1992a,b, Herrmann & Joger 1997) nehmen *Pseudocerastes* und *Eristicophis* in Genstammbäumen von Lenk et al. (2001), Wüster et al. (2008) und der vorliegenden Arbeit eine basale Position ein.

Die Phylogenie innerhalb der Gattung *Montivipera* reflektiert nur teilweise die aktuelle Taxonomie. So weist das Probenmaterial aus dem *raddei*-Komplex nur wenige Haplotypen

mit geringen genetischen Distanzen auf ( $p=0,025$ ), die zwei Schwesterkladen mit *M. latifii* und *M. raddei/albicornuta* bilden.

Proben von *Montivipera albicornuta* aus Khān Shāy (Terra typica, Nilson & Andrén 1985b), den Tekab- und Sahand-Bergen gehören nach Latifi (1991) und Nilson & Andrén (1985b, 1986a) zum Verbreitungsgebiet der Art, gehen jedoch in den Stammbäumen nicht auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück. Die Paraphylie widerspricht der Artdefinition eines Taxons. Gleiches trifft für die Subspezies *M. raddei kurdistanica* zu. Proben aus Qotur (Terra typica, Nilson & Andrén 1986a) und Yüksekova stammen aus dem Verbreitungsgebiet des Taxons (Nilson & Andrén 1986a, Sigg 1987), ohne jedoch eine monophyletische Klade zu bilden. Die Probe von der Terra typica aus Qotur unterscheidet sich genetisch nicht von Proben der Nominatform aus Armenien. Auch die morphologische Diagnose der Unterart *kurdistanica* ist nicht gewährleistet (Franzen & Sigg 1989). Beide Taxa (*albicornuta*, *kurdistanica*) müssen daher als konspezifisch mit *raddei* angesehen werden. Zu dem gleichen Schluss kommen bereits Obst (1982) und Schätti et al. (1991). Nach der Auffassung von Obst sind „...*raddei* und *latifii* eng benachbarte geographische Vertreter ein und derselben Art, zu der sich in Iran wahrscheinlich noch eine dritte, bislang unbeschriebene Form anreicht ...“ (Obst 1982, S. 233). Bei der genannten dritten Form handelt es sich vermutlich um die später von Nilson & Andrén (1985b) beschriebene *albicornuta*.

*Montivipera latifii* bildet in der mt-Genealogie eine monophyletische Gruppe, die als Schwestertaxon der westlichen *raddei/albicornuta*-Populationen aufgefasst werden kann. Nach morphologischen Untersuchungen (Schätti et al. 1991) lässt sich *M. latifii* nicht von *M. raddei* abgrenzen. Obst (1982) und Schätti et al. (1991) betrachten *latifii* daher als konspezifisch mit *raddei*, während Nilson & Andrén (1986a), David & Ineich (1999) und Mallow et al. (2003) *latifii* weiterhin Artstatus zuerkennen.

Eine vollkommen gegensätzliche Situation zeigt sich innerhalb des *xanthina*-Komplexes. Proben der untersuchten Populationen weisen eine bemerkenswerte genetische Struktur auf, die konkordant mit der disjunkten Verbreitung ist. Ihre Verbreitung reicht vom europäischen Thrakien und der Ägäis (siehe Joger & Nilson 2005) bis an die iranische Grenze im Osten (Joger et al. 1988) und die Levante im Süden des Areals (Werner 1938). Den Bergottern des *xanthina*-Komplexes haben sich besonders intensiv die schwedischen Herpetologen Nilson & Andrén (1984, 1985a,b, 1986a,b) und Nilson et al. (1990) gewidmet und drei neue Arten, *M. bulgardaghica* Nilson & Andrén, 1985, *M. wagneri* Nilson & Andrén, 1984 und *M. albizona* Nilson et al., 1990, beschrieben. Spezieskonzepte sowie das geringe Typusmaterial waren der Anlass einer kontrovers und vehement geführten Debatte über den taxonomischen Status der Arten (Schätti et al. 1991, 1992, Nilson & Andrén 1992). Schätti

et al. (1991) negieren die Validität von *bornmuelleri*, *bulgardaghica* sowie *albizona* und fassen sie als konspezifisch mit *xanthina* auf. Ihrer Auffassung nach handelt es sich bei den nominellen Taxa lediglich um polymorphe Populationen von *xanthina*. Nur *M. wagneri* akzeptieren sie als mögliches Taxon. Als wesentliche Argumente gegen den Artstatus der genannten Taxa führen die Autoren unter anderem methodische Defizite, ungenügendes Probensampling und eine inadäquate Bewertung von intraspezifischer Variabilität an.

Beide Opponenten vertreten Standpunkte, die bisweilen den Eindruck hinterlassen, tendenziös zu sein. Die Gegendarstellung von Schätti et al. ist ausführlich recherchiert und präsentiert neue Erkenntnisse aber auch gravierende methodische Schwächen. Schätti et al. (1991) benutzen dieselben meristischen Merkmale und einen nahezu identischen Datensatz, bestehend aus publizierten Werten von Nilson & Andrén (1985a,b, 1986a), Joger et al. (1988), Nilson et al. (1990), der durch neue Werte ergänzt wurde. Durch die rein deskriptive Auswertung ohne statistische Tests fehlt eine echte, zwingende Beweisführung (vergl. Nilson & Andrén 1992). Eine tabellarische Auflistung von Maximum-Minimumwerten lässt Spielraum für subjektive Interpretation. Zudem beschränken sich die Autoren auf 11 Merkmale, von denen sie einige als grundsätzlich ungeeignet erachten: „Many scale characters (e.g. circumoculars, number of dorsal head scales) are not useful in characterizing the various forms of ‘mountain vipers’ because they show a typical feature of normally distributed characters, namely an increasing range with larger sample size“ (Schätti et al. 1991, S. 318). Unter Ausschluss der Circumocularia und dorsalen Kopfschuppen reduziert sich ihre Statistik auf sechs brauchbare Merkmale, die Grundlage ihrer Argumentation sind. Grundsätzlich ist die Abwesenheit diagnostisch geeigneter Merkmale kein Beweis für die Zugehörigkeit verschiedener Populationen zum selben Taxon. Leider sind die Autoren auch nicht bestrebt, weitere Merkmale in ihre Untersuchung einzubeziehen. Ungeeignet ist auch die geographische Gruppierung der Proben. So verhindert das Poolen westanatolischer *xanthina*-Populationen ein Erkennen von regionalen Unterschieden im Vorhinein. Der methodische Aufbau der Arbeit ist für eine differenzierte Analyse der Berggottern schlicht ungeeignet.

Die genetischen Stammbäume zeigen hingegen ein sehr viel differenzierteres Bild, das von der gegenwärtigen Taxonomie nicht erfasst wird. In der Genealogie der mt-Stammbäume gliedern sich die anatolischen Berggottern in zwei geographische Kladen (westanatolische und ostanatolische Berggottern).

Die östliche Gruppe umfasst die Taxa *bornmuelleri*, *wagneri*, *bulgardaghica* und *albizona*.

Die Identifizierung von *albizona*-Haplotypen in der Terra typica von *bulgardaghica* bestätigt die pleistozäne Verschiebung von Lebensräumen (siehe Kapitel 8) und den sekundären

Kontakt der beiden Linien oder kann alternativ als nicht abgeschlossenes „Lineage-sorting“ interpretiert werden. Für die genetische Introgression existiert ein bemerkenswerter Beleg von Schätti et al. (1991): „Some males from ‚Kar Boğaz‘ area (...) have a color pattern resembling *wagneri*, in that the anterior blotches have brownish centers (...), and the pattern and coloration on the anterior dorsal parts of MHNG 2497.48 resembles the male paratype of *albizona*.“ (Schätti et al. 1991, S.315). Die Autoren schlussfolgern daher: „There can be no doubt that this latest form of ‚mountain viper‘ (i.e. *albizona*) is identical with the population of *xanthina* from ‚Kar Boğaz‘...“ (Schätti et al. 1991, S. 317). Der morphologische Befund ist ein berechtigtes Argument zu dieser Annahme. Morphologische Untersuchungen von Mulder (1994) an einer größeren Stichprobe von *albizona* zeigen nur geringe meristische Unterschiede zu *bulgardaghica*.

Doch Introgression oder Hybridisierung gehören zu natürlichen Prozessen in Kontaktzonen unterschiedlicher evolutionärer Linien, für die es in der paläarktischen Herpetofauna eine Reihe von Belegen gibt (z.B. Martı́nez-Freirı́a 2009). Schätti et al. (1991) bedenken: „It is therefore surprising that sympatry of these forms is unknown until now, although it could be expected that areas of secondary overlapping of different „species“ should exist.“ (S. 316). Paläarktische Vipern haben sich allopatrisch durch Anpassung an unterschiedliche ökologische Nischen differenziert. Reproduktive Barrieren mussten daher nicht zwangsläufig etabliert werden. Nilson & Andrén (1992) schreiben dazu: „A biological species concept is not testable for allopatric taxa and demonstrated reproductive cohesion in the laboratory is of low value and is the reason for the main criticisms of the biological species concept...“ (S. 421).

*Montivipera wagneri*, die aufgrund ähnlicher Färbung in die unmittelbare Verwandtschaft zu *albizona* gestellt wurde (Nilson et al. 1990, Mulder 1994), unterscheidet sich jedoch von *albizona* deutlich durch abweichende Schuppenwerte (Mulder 1994), die in Konkordanz zu den genetischen Stammbäumen sind. Während Schätti et al. (1991) unsicher über den Status des Taxons sind, wird *wagneri* von Herrmann et al. (1987), Joger et al. (1988), Mulder (1994), Lenk et al. (2001) als valide angesehen.

Die ursprünglichste Art innerhalb der ostanatolischen Bergottern ist *M. bornmuelleri* (Werner 1898), deren Status historisch ebenfalls sehr kontrovers bewertet wurde. Nachdem Schwarz (1936) *bornmuelleri* mit *xanthina* synonymisierte, revidierte sich Werner (1938) und schloss sich der Meinung von Schwarz an. Mertens (1967) revalidierte das Taxon nach erneuter morphologischer Untersuchung und betrachtet es als „unbedingt valid“ (S. 154). In breiter Übereinstimmung wurde *bornmuelleri* von allen Schlangen-Spezialisten anerkannt (Joger 1984, Nilson & Andrén 1986a, Brodmann 1987, Gruber 2009). Trotz der geographisch isolierten Lage synonymisieren Schätti et al. (1991) *bornmuelleri* erneut mit *xanthina* und

vertreten eine Ansicht aus dem Beginn des 20. Jahrhunderts, der andere Autoren nicht folgen (Mulder 1994, David & Ineich 1999, Mallow et al. 2003, Joger & Nilson 2005). Schätti et al. (1992) unterstellen ihren Kollegen gar den Artstatus von *bornmuelleri* aus eigennützigen Gründen anzuerkennen: „A study of some papers devoted to ‚mountain vipers‘ gives the impression that this discipline has developed a curious impetus of its own due to circular reasoning (i.e., the status of *bornmuelleri* and *latifii*).“ (S. 425).

Die von Schätti et al. (1992) zu Recht kritisierten Kenntnisdefizite über die genaue Verbreitung der anatolischen Bergottern sind bedauernswert, ihre Beseitigung wird die Grundzüge des Stammbaumes aber nicht verändern. Neue Haplotypen werden die Topologie ergänzen und biogeographische Szenarien verändern, doch genetische Distanzen und molekulare Divergenzzeiten werden auch unter Hinzunahme neuer Linien bestehen bleiben.

Die westanatolische Bergotter wurde taxonomisch bisher als monotypische Art ohne Subspezies aufgefasst (z.B. Joger 1984, Nilson & Andrén 1986a, Schätti et al. 1991, Mallow et al. 2003). Erstaunlicherweise ist die genetische Differenzierung innerhalb der westanatolischen Bergottern ( $p=0,054$ ) jedoch größer als innerhalb der polytypischen ostanatolischen Bergottern ( $p=0,040$ ).

Obwohl hierarchische Cluster-Analysen von Nilson & Andrén (1986a) wesentliche morphologische Unterschiede zwischen den Populationen ergaben, blieben sie ohne taxonomische Konsequenzen. Die Autoren unterscheiden wahrscheinlich aufgrund von inkonsistenten Ergebnissen zwischen den geschlechtsspezifischen Analysen lediglich eine südliche und eine nördliche Gruppe.

Genetische mt-Genealogien zeigen jedoch substantielle, statistisch robust gestützte Strukturen, die denen der ostanatolischen Bergottern äquivalent sind, aber dennoch bisher taxonomisch unentdeckt blieben (Stümpel & Joger 2009). In Ost-West-Richtung trennen sich die westanatolischen Bergottern in den evolutionären Linien Taurus, Lykien, Ägäis und griechisch Thrakien auf.

Das morphologische Erscheinungsbild der westanatolischen Bergottern gibt oberflächlich betrachtet keinen Anlass, hohe genetische Diversität zu vermuten. Ihr Phänotyp ist wenig variabel und geprägt durch schwarzbraune, ovale bis rhomboid-förmige Zeichnungselemente, die konsistent in allen Populationen das Schuppenkleid zieren und wenig Potential für eine diagnostische Merkmalsanalyse bieten. Es ist unübersehbar, dass die vier Arten *M. bornmuelleri*, *M. wagneri*, *M. bulgardaghica* und *M. albizona* aufgrund abweichender Rückenzeichnung und Farbgebung mehr augenscheinlich erkennbare Merkmale zur Artbeschreibung bieten als die westanatolischen Bergottern. Dennoch hat die



Aufspaltung in die rezenten Stammlinien der westanatolischen Bergottern eher stattgefunden als die ihrer ostanatolischen Pendants.

In Anbetracht der neuen molekularen Stammbaumhypothesen sollten die anatolischen Bergottern einer taxonomisch nomenklatorischen Revision unterzogen werden. Sofern ost- und westanatolische Bergottern zwei Schwesterkladen sind, wäre unter phylogenetischen Gesichtspunkten eine Auftrennung in zwei Arten konsequent. Ostanatolische Bergottern müssten aus Prioritätsgründen unter *bornmuelleri* (Werner 1898) mit den Subspezies *wagneri*, *bulgardaghica* und evtl. *albizona* vereint werden. Westanatolische Bergottern könnten weiterhin mit vier neuen Subspezies unter *xanthina* Gray, 1849 geführt werden. Obgleich die Sub-Kladen der westanatolischen Bergottern maximal statistisch gestützt sind, können ihre phyletischen Beziehungen zu den ostanatolischen Bergottern nicht zweifelsfrei geklärt werden. Haploide (mt) und diploide (nc) Genealogien stehen hier im Widerspruch. Phylogenetische Informationen der Mitochondrien favorisieren eine Schwesterbeziehung

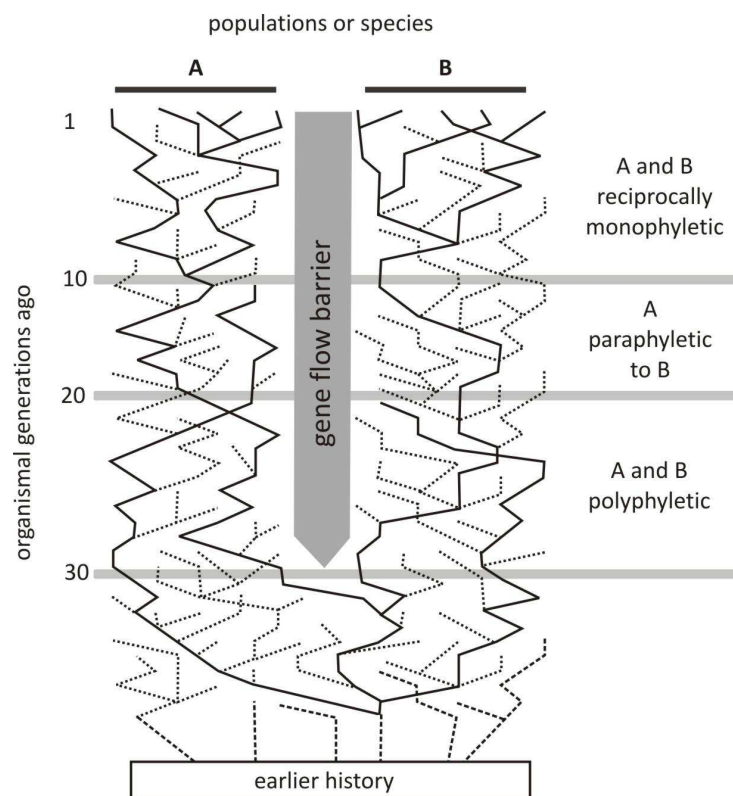


Abbildung 29: Illustriert die Transition phylogenetischer Signale in einer Genealogie entlang der Zeit (verändert nach Avise 2007, S. 17). Nach Aufspaltung der Linien ist die stammesgeschichtliche Information zunächst trotz Vikarianz noch polyphyletisch. Im weiteren zeitlichen Verlauf erlöschen einige Linien (Lineage-Turnover) und die Genealogie tritt in die paraphyletische Phase ein. Mit zunehmendem Alter und weiterhin bestehender Vikarianz werden die Linien durch „Lineage-Sorting“ reziprok monophyletisch. Die Geschwindigkeit mit der die Transition voranschreitet ist eine Funktion der Populationsdemographie.

der beiden Gruppen, während Kerngene auch die Monophylie der ostanatolischen Bergottern stützen, führen sie die Kladen der westanatolischen Bergottern auf einen polyphyletischen Ursprung zurück (siehe Kapitel 5).

Allopatrische Trennung zweier Linien wird neben physischen Faktoren insbesondere durch die Zeit und die Populationsgröße bestimmt (z.B. Avise 2007). Beide Faktoren sind möglicherweise die Erklärung für die Inkongruenz der beiden Stammbäume.

Evolutionsraten zwischen cytoplasmatischem (mt) und autosomalem (nc) Genom unterscheiden sich, weil die effektive Populationsgröße diploider Kerngene um ein Vierfaches größer ist als im haploiden mt-Genom (z.B. Avise 2007). Demzufolge verläuft die Akkumulation von Mutationen in Mitochondrien und die in Abbildung 29 dargestellten Transitionen phylogenetischer Signale wesentlich schneller ab als in den Kerngenen. Während die Kerngene noch die polyphyletische Phase repräsentieren, sind die mt-Gene bereits reziprok monophyletisch.

Populationsdemographische Berechnungen aus Kapitel 8 liefern einen weiteren Beleg für die phylogenetische Inkongruenz (mt versus nc) und die Bedeutung der Populationsgröße für die Transitionsgeschwindigkeit der phylogenetischen Signale. Nach Avise (2007) tragen rezente Populationen neben neu entstandenen Haplotypen aufgrund des Lineage-Sorting nur einen Bruchteil der genetischen Diversität ihrer Vorfahren. In zwei durch Vikarianz getrennten Linien mit unterschiedlicher effektiver Populationsgröße schreitet der Prozess des Lineage-Sorting unterschiedlich schnell voran und kann zur Diskordanz zwischen Gen- und Artstammbaum führen. „If evolutionary effective population sizes of the species traversing the relevant nodes in the phylogenetic tree were larger than the internodal times as measured in organismal generations, then lineage sorting may not have proceeded to reciprocal monophyly in all gene trees of the immediate descendents (Tateno et al. 1982).“ (Avise 2007, S. 18).

Mitochondrien und Kerngene zeigen übereinstimmend ostanatolische Bergottern als monophyletische Gruppe. Ihre effektive Populationsgröße ist jedoch nur halb so groß wie die der westanatolischen Bergottern (siehe Kapitel 8), die in ihrem nc-Genpool mehr ancestrale Haplotypen aufweisen und daher in den Genealogien polyphyletisch sind.

Die Levanteottern der Gattung *Macrovipera* sind mit Ausnahme der Insel- und Küstenvorkommen des Mittelmeeres Faunenelemente asiatischer Steppen und Halbwüsten. Von der Levanteotter wurden bis dato sieben Subspezies beschrieben (vergl. Ščerbak & Böhme 2005), deren Status bislang umstritten sind. Die Nominatform *lebetina* Linnaeus, 1758 ist auf Zypern beschränkt (Mertens 1951), zu der Billing & Schätti (1984) und Mulder (1995)

auch die Populationen von der türkischen Südküste stellen. Nach der Entdeckung weiterer Küsten-Populationen (Anamur, Silifke) betrachtet Böhme (1987) den Status weiterhin als ungeklärt. Ein weiterer Neufund aus dem westlichsten festländischen Fundort (Incekum) durch Entzeroth (1989) dehnte das Areal gen Westen aus, erbrachte aber keine neuen taxonomischen Erkenntnisse. Zu *obtusa* Dwigubskij, 1832 werden die Populationen des Nahen Ostens einschließlich des Kaukasus und Transkaukasus gerechnet (z.B. Mertens & Wermuth 1960, Joger 1984, Al-Oran et al. 1998, Hraoui-Bloquet 2002, vergl. auch Ščerbak & Böhme 2005). Aus der Umgebung der türkischen Stadt Birecik am Euphrat wurde *euphratica* Martin, 1838 beschrieben, die von den meisten Autoren als Synonym von *obtusa* aufgefasst wird (Joger 1984, Billing & Schätti 1984). *Macrovipera l. turanica* Černov, 1940, die von Joger (1984) zu *obtusa* gestellt wird, ist aus Zentralasien bekannt. Chikin & Ščerbak (1992) trennten Populationen aus dem turkmenischen Murghabtal als eigene Unterart *cernovi* von *turanica* ab. Durch die Rarität von Belegexemplaren in Vergessenheit geraten zu sein scheint die Unterart *peilei* Murray, 1892, deren Terra typica in den schwer zugänglichen Regionen Südafghanistans (Zandra) und Ostpakistans (Quetta) liegt. David & Ineich (1999) erwähnen die Möglichkeit, es könne sich bei *cernovi* um ein Synonym von *peilei* handeln. Extraterritorial, ohne Bindung an das asiatische Verbreitungsgebiet, ist das nordafrikanische Vorkommen von *M. l. transmediterranea* Nilson & Andrén, 1988, von der bisher kein lebendes Exemplar für die Wissenschaft bekannt wurde.

Die Mitochondrien-Gene der Levanteottern segregieren in sechs Haplogruppen, die in Konkordanz mit der Taxonomie nomineller Subspezies sind und die Validität aller untersuchten Taxa rechtfertigen. Die räumliche Verteilung der intraspezifischen Phylogruppen ergibt plausible biogeographische Gruppen. *Macrovipera l. turanica* und *cernovi* haben einen gemeinsamen Ursprung in Mittelasien und bilden die Schwestergruppe zu *obtusa* und *euphratica* aus dem Nahen Osten. Billing & Schätti (1984) betrachten die Beschreibung von *euphratica* als sehr dürftig und die Terra typica als fragwürdig. Joger (1984) synonymisiert die Unterart mit *obtusa*.

Mediterrane Populationen (Zypern, türkische Mittelmeerküste, Kykladen) sind monophyletisch. Ihre Linien trennten sich in geologisch junger Zeit im Pleistozän (siehe Kapitel 6). Die Tatsache, dass eine Levanteotter aus Silifke (türkische Mittelmeerküste) denselben Haplotyp wie die Populationen des 850 km entfernten Kykladenarchipels aufweist, ist taxonomisch relevant und widerspricht der Auffassung von Nilson & Andrén (1988), es handele sich um eine seit drei bis fünf Millionen Jahren isolierte eigenständige Art.

Die Monophylie der Populationen aus Zypern, den Kykladen und Mersin stützt die seit langem kursierende Vermutung einer gemeinsamen Abstammung (Billing & Schätti 1984, Brodmann 1987, Mulder 1995), die erst jüngst von Göçmen et al. (2007) widerlegt schien.

Am Golf von Iskenderun verläuft eine Haplotypen-Grenze, das zeigen die vorliegenden Genealogien. Proben aus dem östlichen Küstenbereich des Golfes clustern mit *obtusa*, der westliche Fundort Silifke mit der Nominatform von Zypern. Auf den Grenzverlauf machten bereits Billing & Schätti (1984) aufmerksam, nur dass sie ihn geographisch weiter im Osten vermuteten. Göçmen et al. (2007) ignorierten diese Tatsache und benutzten für ihre Untersuchungen Probenmaterial zweier verschiedener Subspezies, um zu dem Zirkelschluss zu kommen, dass südanatolische Levanteottern nicht zur Nominatform gestellt werden sollten.

Grundsätzlich stehen die mt-Stammbäume auch im Konflikt mit den Serumalbumin-Stammbäumen von Herrmann et al. (1992b), die keine unmittelbare Verwandtschaft zwischen Levanteottern von Zypern und den Kykladen nachwiesen.

Der Vorschlag von Nilson & Andrén (1988), *schweizeri* als eigene Art aufzufassen, macht *lebetina* paraphyletisch und muss abgelehnt werden, weil der *schweizeri*-Haplotyp geographisch nicht ausschließlich auf die Kykladen beschränkt ist und die geringe genetische Distanz zu den Levanteottern von Zypern eine gemeinsame Abstammung in evolutionsgeschichtlich junger Zeit aufzeigt.

Wollte man die Inselformen (inklusive Mersin) als eigenständige Art *Macrovipera lebetina* (Terra typica restricta: Zypern, Mertens & Müller 1928) von den übrigen festländischen Taxa abtrennen, wäre die Kykladenviper (inkl. Mersin) in den Rang einer Subspezies *M. l. schweizeri* zu versetzen. Konsequenterweise müssten die evolutionären Linien *obtusa* (mit ssp. *euphratica*) und *turanica* (mit ssp. *cernovi*) ebenfalls als eigene Arten aufgefasst werden.

Betrachtet man *Macrovipera* hingegen als Gattung, scheint der Subspezies-Status der nominellen Taxa *lebetina*, *schweizeri*, *obtusa*, *euphratica*, *turanica* und *cernovi* gerechtfertigt zu sein.

Mangels Probenmaterial bleibt der Status von *peilei* und *transmediterranea* leider unklar.

Die neu identifizierte südiranische Population von *Macrovipera* stellt eine basale evolutionäre Linie dar, die wegen ihrer großen genetischen Divergenz zu *lebetina* ( $p=0,093$ ) Artstatus erhalten sollte.

## 8 Phylogeographie der Gattungen *Montivipera* und *Macrovipera*

### 8.1 Einleitung

Die Phylogeographie ist eine junge Forschungsdisziplin, die mit der Prägung des Begriffes durch Avise et al. (1987) aus der Taufe gehoben wurde. Sie befasst sich explizit mit der Mikroevolution von Genealogien in räumlich-zeitlichen Dimensionen und versucht, Zusammenhänge zwischen genetischen (phyletischen) Linien und ihrer geographischen Verteilung innerhalb einer Art oder unter nahe verwandten Arten aufzudecken (Avise 2004, Avise 2009). Mit anderen Worten, im Fokus der Disziplin stehen historische oder phylogenetische Komponenten der Populationsstruktur, die letztendlich die Initialzündung der Speziation sind (siehe z.B. Avise 2007, 2009).

Während sich die klassische Populationsgenetik mit Allel-Frequenzverteilungen in Populationen beschäftigt (Ewens 1979) und die Phylogenetik Verwandtschaften zwischen Arten rekonstruiert, nutzt die Phylogeographie Konzepte beider Disziplinen und hat sich als integrative Disziplin der Evolutionsbiologie etabliert (Hickerson et al. 2010). Zu Recht wird sie als Brücken-Disziplin zwischen Populationsgenetik und Phylogenetik betrachtet (Avise 2007).

Theoretische Konzepte der Phylogeographie basieren auf Gen-Stammbäumen. Genealogien von Genen unterliegen genauso wie Art-Stammbäume phylogenetischen Prinzipien (Avise 2007). Ihre Abstammung lässt sich daher mit den gleichen phylogenetischen Algorithmen berechnen wie in der Macro-Phylogenie (Avise 2007). Auf der innerartlichen Ebene sind die Konzepte zwischen Genealogie und historischer Populations-Demographie unabdingbar miteinander verknüpft. Im Sinne von Avise (2007) spiegelt jeder Gen-Stammbaum einen realisierten Prozess der historischen Populations-Demographie wider. Dieses Erkenntnis war Grundstein der Coalescent-Theorie (Hudson 1990), die ihrerseits mit neuen Hypothesen die Phylogeographie nährt. So wurde mithilfe der Coalescent-Theorie geschlossen, dass die Populationsgröße ( $N$ ) der meisten heutigen Arten um ein Vielfaches höher ist als die effektive Populationsgröße ( $N_e$ ) der historischen Ahnen. Demzufolge ist die Reduktion der effektiven Populationsgröße ( $N_e$ ) durch „Bottleneck“ oder „Selective-Sweeps“ eine wichtige Voraussetzung für die Evolution neuer Linien und die Abspaltung neuer Arten.

Entsprechend ihrer interdisziplinären Stellung in der Evolutionsbiologie wurde mithilfe phylogeographischer Methoden unterschiedlichsten Fragestellungen nachgegangen (siehe Hickerson et al. 2010). So wurde versucht, Aspekte der Phylogeographie für die Artabgrenzung (z.B. Leavitt et al. 2007) oder für das Aufzeigen von historischen

Hybridisierungsereignissen zu nutzen (z.B. Swenson & Howard 2005). Andere Autoren untersuchten in vergleichenden phylogeographischen Analysen Genfluss und Divergenz zwischen sympatrisch verbreiteten Arten in Raum und Zeit und konnten so neue Erkenntnisse über den Einfluss historischer Ereignisse auf die rezente Biodiversität gewinnen (z.B. Hewitt 2000). In Kombination mit Techniken wie der Klimamodellierung ist es auch möglich, naturschutzrelevante Vorhersagen über Arealveränderungen und demographische Entwicklungen der Biota unter Einfluss der Klimaerwärmung zu treffen (z.B. Williams et al. 2007).

In den Anfängen der Phylogeographie wurden Genstammbäume in einem geographischen Kontext interpretiert und die geographische Verteilung sowie das Alter von Linien direkt vom Stammbaum ermittelt. In einer der ersten phylogeographischen Studien (Avice et al. 1979) untersuchten die Autoren mit Hilfe von Restriktions-Enzymen, der Karyologie und der Protein-Elektrophorese die geographische Verteilung von Genmustern. Mit dem Aufkommen der Sequenzieretechnologie gelangten DNA-Sequenzdaten in den Fokus des Interesses. Insbesondere mt-Sequenzen waren wegen ihrer leichten Generierbarkeit und hohen Evolutionsraten geeignet, Genealogien geographisch zu strukturieren. Die überwältigende Mehrzahl der Publikationen zeigt, dass nahezu alle Tierarten phylogeographisch strukturiert sind (Avice 2004). Mitochondrien sind aufgrund ihres uniparentalen, asexuellen Erbganges jedoch nur geeignet, die maternale Genealogie einer Population zu rekonstruieren. Idealerweise sollten neben maternalen Markern auch single-copy (scn) Kerngene verwendet werden, die jedoch wegen diverser Hürden vergleichsweise seltener genutzt werden (Avice 2009).

Nunmehr geht das Methodenspektrum der Phylogeographie über die geographische Interpretation von Genstammbäumen weit hinaus. Sequenz-Datensätze geographisch definierter Gruppen können deskriptiv (summary statistics) erfasst werden und Hypothesen zu demographischen Entwicklungen und zur Struktur von Populationen in Verbindung mit Permutationstests untersucht werden (z.B. Excoffier et al. 1992). Lange waren die Nested-Clade-Analyse (NCPA) und der Inference-Key (Templeton 1998, 2004) die Methoden der Wahl, um geographische Zusammenhänge in Genealogien nachzuweisen. Die Ergebnisse waren jedoch häufig schwer interpretierbar und ließen sich nicht statistisch testen. Als nachteilig erwies sich auch die Beschränkung der Analyse auf einen Locus (z.B. Panchal & Beaumont 2007).

Die Phylogeographie entwickelte sich von einer anfänglich rein deskriptiven Methode hin zu Coalescent-basierten Modellen (Kuhner 2008), die es, eingebettet in ein bayesianisches oder Likelihood-Verfahren ermöglichen, historische Hypothesen a priori zu testen (z.B. Fagundes et al. 2007), demographische Szenarien im Raum (Lemmon & Moriarty Lemmon

2008) und Zeit (Drummond & Rambaut 2007) zu rekonstruieren und auf räumliche Kongruenz zwischen ko-verbreiteten Arten zu testen (z.B. Carnaval et al. 2009).

Über die Phylogeographie der orientalischen Vipern wurden bisher nur vage Hypothesen formuliert (Nilson & Andrén 1986a), die zu dem Zeitpunkt ihrer Postulierung durch statistische Tests nicht überprüfbar waren.

Das Hauptanliegen dieses Kapitels ist es, Faktoren zu identifizieren, die das heutige Verbreitungsmuster sowie deren genetische Diversität erzeugten. Dazu wurden mithilfe eines Modell basierten Likelihood-Verfahrens a priori Thesen zur Phylogeographie getestet und der Ursprung der Ahnen sowie historische Migrationsrouten mit dem Programm PhyloMapper (Lemmon & Moriarty Lemmon 2008) rekonstruiert.

Einige Phylogruppen unter den Bergottern (*Montivipera*) haben eine relikartige Verbreitung, die nach Nilson & Andrén (1986a) auf eine pleistozäne Arealverkleinerung zurückzuführen ist. Drastische Veränderungen der Populationsgrößen hinterlassen Signaturen im Genom, die nachweisbar sind. Um Einblicke in die historische Populationsdemographie zu erhalten, wurden für ausgewählte geographische Gruppen die effektive Populationsgröße ( $N_e$ ) auf Basis der Coalescent-Theorie mit dem Programm BEAST berechnet (Drummond & Rambaut 2007). Darüber hinaus wurde mit Mismatch-Verteilungen nach Indizien für eine Populationsexpansion gesucht und auf Abweichung von der Nullhypothese (konstante Populationsgröße) durch die Berechnung von  $F_s$  (Fus 1997), Ramos-Onsins und Rozas (2002)  $R_2$  sowie Harpendings (1994) Raggedness Index  $R_i$  getestet.

## 8.2 Ergebnisse

### 8.2.1 Phylogeographie

In allen getesteten Kladen (siehe Tabelle 17) konnte ein phylogeographischer Zusammenhang zwischen phylogenetischer und geographischer Distanz nachgewiesen werden. Der „Randomization-Test“ ist für alle fünf Kladen auf dem  $\alpha = 0,01$  Niveau signifikant. Dies gilt selbst für den *raddei*-Komplex, der nur über geringe genetische Variabilität verfügt und mit 12 Haplotypen die kleinste Klade repräsentiert.

In dem zweiten Test („Center-Test“, Tabelle 17) wurde untersucht, ob der Vorfahre (Stammlinienvertreter) einer rezenten Gruppe das gleiche Verbreitungszentrum besiedelte wie seine Nachfahren. Die Teststatistik zeigt Signifikanz in nur einem von fünf Fällen an. Für die Gattung *Montivipera* wird die Nullhypothese ( $H_0$  = der Vorfahre besiedelte das Zentrum des rezenten Nachfahren) auf dem  $\alpha = 0,01$  Signifikanzniveau abgelehnt. Hingegen waren die Vorfahren der rezenten Artkomplexe *Montivipera xanthina* und *M. raddei* sowie die

Vorfahren von *Macrovipera lebetina* und die der Gattung *Macrovipera* im Verbreitungszentrum der heutigen Kronengruppen vertreten (alle  $p > 0,2$ ).

Der „Overall-Directionality-Test“ untersucht das Ausbreitungsverhalten und geht der Frage nach, ob das Verbreitungsmuster entlang der Genealogie zufällig war. Alle untersuchten Gruppen haben sich, wie in Tabelle 17 gezeigt, in einer nicht zufälligen Richtung ausgebreitet.

Abbildung 30 bis Abbildung 33 zeigen die Maximum-Likelihood-Berechnungen zum Ursprung („Centers of Origin“) von *Macrovipera lebetina* und der beiden Artkomplexe *Montivipera xanthina* und *M. raddei*. Der Ursprung der *Montivipera xanthina*-Komplex-Radiation liegt im Bereich des heutigen Anatolien im Taurusgebirge (Lat 37,94; Long 34,15; InL -346,30). Die Likelihood-Oberfläche beschränkt das Zentrum des Ursprunges ziemlich präzise auf das südliche Zentralanatolien. Alle Orte außerhalb der 95%-Konfidenzoberfläche sind auf dem  $\alpha = 0,05$  Signifikanzniveau unwahrscheinlich.

Im Zentrum des Ursprunges spaltete sich der Stammlinienvertreter des *Montivipera xanthina*-Artkomplexes in zwei Schwesterguppen auf (siehe Abbildung 31). Eine westanatolische Stammgruppe verbreitete sich in westlicher Richtung und besiedelte den West-Taurus bis zur ägäischen Küste. Die Ausbreitung erfolgte offenbar nicht entlang der Mittelmeerküste sondern über das heutige anatolische Plateau. Von hier aus wurden über verschiedene Migrationsrouten der West-Taurus und die ägäische Küste besiedelt. Rezente Vertreter basaler Linien sind die Haplotypen aus Isparta, Geyik Dağı und Adage sowie die lykischen Populationen. Die ägäische Küstenpopulation (Ephesus) war wiederum Ausgangspunkt für eine neue Radiation. Von hier aus sind die südlichen Sporaden (Kos) und das türkische Thrakien besiedelt worden. In einer zweiten Besiedlungswelle wurde das europäische Festland erneut erreicht. Ausgehend von der Region Biga Yarımadası wurde die Insel Lesbos und das griechische Thrakien kolonisiert. Die europäischen Festlandspopulationen von *M. xanthina* sind also nicht unmittelbar miteinander verwandt, sondern gehen auf zwei unabhängige Migrationsereignisse zurück.

Die zweite ostanatolische Stammgruppe kolonisierte Zentral- und Ostanatolien sowie die Levante. Ausgangspunkt für drei Radiationseignisse basaler Stammarten waren die Gebirgsmassive des Taurus und Antitaurus. In einem ersten Radiationseignis spaltete sich die Stammart in eine sich südlich ausbreitende Linie, deren Nachfahren (*Montivipera bornmuelleri*) die heutige Levante bewohnen und eine zweite Linie, die erneut Ausgangspunkt für Artbildung war. Auf sie geht die reliktiert verbreitete *M. wagneri* im äußersten Ostanatolien zurück sowie *M. bulgardaghica* und *M. albizona*. Im Vergleich zu *M. wagneri*, die weit außerhalb des Entstehungszentrums ihrer Ahnen vorkommt, bewohnen *M. bulgardaghica* und *M. albizona* nachwievor das gleiche Gebiet wie ihre Stammformen.



Der Ursprung des östlich verbreiteten Artkomplexes *Montivipera raddei* liegt im heutigen Nordwestiran (Lat 37,26; Long 48,62; InL -452,11). Auch hier schränkt die Likelihood-Oberfläche das Ursprungsgebiet auf eine relativ kleine Region von 400 bis 500 km im Durchmesser ein.

Die Migrationsrouten des *M. raddei*-Komplexes verlaufen entlang einer NW-SO-Achse. Mit Ausnahme der basalen *M. latifii*-Linie, die eine Exklave im äußersten SO des Verbreitungsgebietes bewohnt, verlief die Migration vom Zentrum des Ursprunges tendenziell in nordwestlicher Richtung. Radiationsergebnisse jüngerer Zeit sind ausschließlich auf sich nordwestlich ausbreitende Stammarten beschränkt. Vom Zanzan-Tal ausgehend wurden die Gebirge Tekab, Sahand sowie Khān Shāy besiedelt. Ein zweites Ausbreitungszentrum lag im Gebiet des Ararat. Von hier aus wurden neue Lebensräume in allen Himmelsrichtungen erobert.

Der Ort mit dem höchsten Likelihood für die Radiation von *Macrovipera lebetina* liegt nordöstlich des Urmiasees (Lat 38,87; Long 45,09; InL -356,82) im heutigen Iran. Die Likelihood-Oberfläche von *M. lebetina* umspannt jedoch aufgrund des großen Verbreitungsareales eine wesentlich größere Fläche als bei den zuvor erwähnten Artkomplexen. Sie reicht in Nord-Süd-Ausdehnung vom Kaukasus bis zur arabischen Halbinsel und in West-Ost-Richtung von Zentral-Anatolien zu den östlichen Ufern des Kaspischen Meeres.

Tabelle 17: Statistische Tests zur Phylogeographie orientalischer Vipern für den Datensatz 2566 (nach Lemmon & Moriarty Lemmon 2008). „Phylogeographic-Association-Test“ auf Korrelation zwischen phylogenetischer und geographischer Distanz in fünf Kladen. Der „Phylogeographic-Association-Test“ verwendet den dispersal Parameter ( $\Psi$ ) als Indikator für phylogeographische Korrelation. Der p-Wert zeigt an, ob der Zusammenhang signifikant von der Nullhypothese ( $H_0$  = es gibt keine phylogeographische Korrelation) abweicht. Die Test-Statistik des „Center-Tests“ verwendet die Differenz der Likelihoodwerte aus der Alternativ- und Nullhypothese in einem Likelihood-Ratio-Test ( $\ln L_A - \ln L_0$ ), um Aussagen über die Arealausbreitung zu treffen. Signifikanz dieses Tests besagt, dass der Vorfahre das Verbreitungszentrum der beprobten Viperngruppe (Klade) nicht besiedelte. Alle untersuchten Kladen zeigen ein nicht zufälliges Ausbreitungsverhalten („Overall-Directionality-Test“). Sterne zeigen Signifikanz auf dem  $\alpha = 0,05$  Niveau an. Nach Optimierung aller Parameter wurde die Nullverteilung aus 100 Stichproben („Randomizations“) generiert.

Phylogeographic Association Test				Center Test		Direct. Test
Klade	Haplotypen [n]	$\Psi$	P-Wert	FG	$\ln L_A - \ln L_0$	P-Wert
<i>raddei</i> -Komplex	12	252,9	<0,01*	2	3,82	>0,1
<i>xanthina</i> -Komplex	40	282,7	<0,01*	2	1,19	>0,2
<i>Montivipera</i>	52	290,5	<0,01*	2	10,26	<0,01*
<i>lebetina</i>	29	1075,8	<0,01*	2	1,82	>0,3
<i>Macrovipera</i>	31	1055,4	<0,01*	2	2,23	>0,3

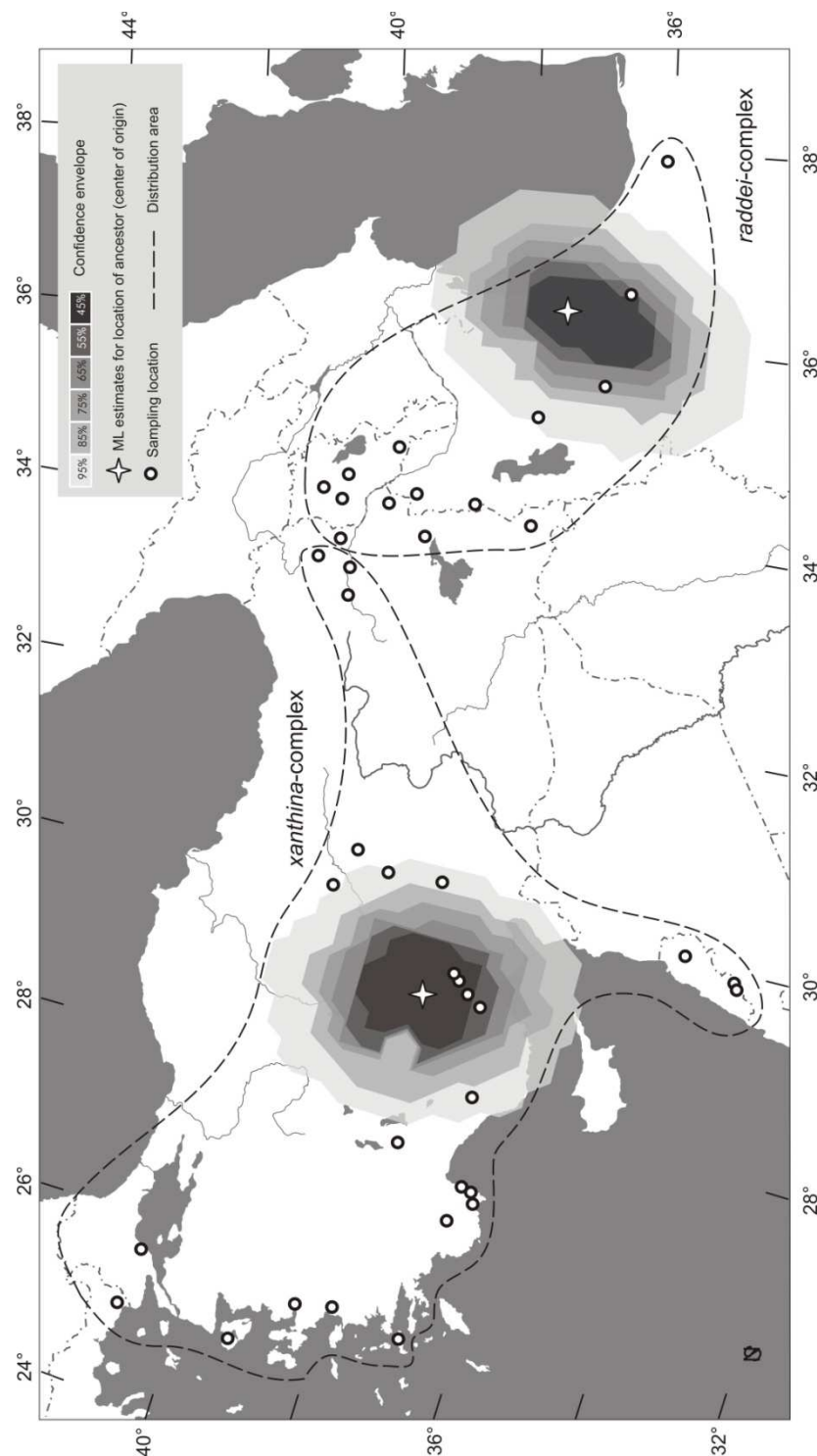


Abbildung 30: Maximum-Likelihood-Berechnungen zum geographischen Ursprung des *Montivipera xanthina*-Komplexes und des *Montivipera raddei*-Komplexes (Datensatz 2566). Kleine offene Kreise zeigen die Fundorte des Probenmaterials. Die grau schattierten Konturen sind Likelihood-Oberflächen unter der Annahme eines Zusammenhanges zwischen phylogenetischer und geographischer Distanz. Die Konturen repräsentieren verschachtelte Konfidenzintervalle in 10%-Abstufungen (äußere hellgraue Kontur 95%, innere dunkelgraue Kontur 45%). Alle Orte außerhalb der 95%-Konfidenzintervalle sind signifikant schlechter als die Orte mit dem besten Maximum-Likelihood-Wert im Zentrum der Oberflächen (weiße Sterne). Gestrichelte Linien markieren das Verbreitungsareal der Artkomplexe.

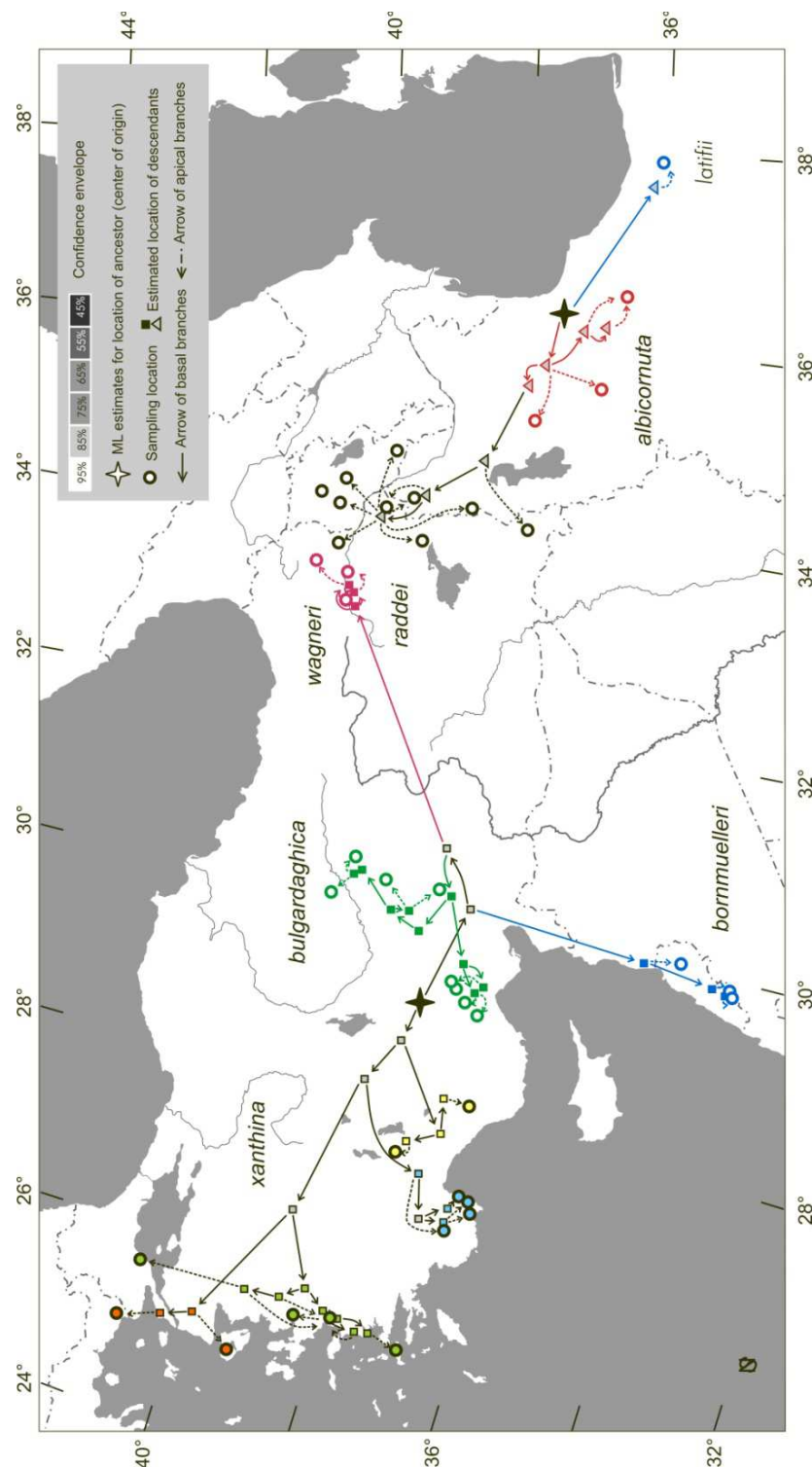


Abbildung 31: Maximum-Likelihood (ML)-Migrationsrouten für die Vorfahren des *Montivipera xanthina*-Komplexes und des *Montivipera raddei*-Komplexes (Datensatz 2566). Pfeile geben die Migrationsrichtung an, indem sie vom Ort des Vorfahren zum Ort des Nachfahren zeigen. Durchgezogene Pfeile verbinden basale Populationen interner Knoten (hohle Quadrate beim *xanthina*-Komplex, Dreiecke beim *raddei*-Komplex), während gestrichelte Pfeile auf die Fundorte rezenter Populationen zeigen (schwarze Kreise beim *xanthina*-Komplex, graue beim *raddei*-Komplex). Sterne zeigen den ML-Ursprung des *xanthina*-Komplexes und des *raddei*-Komplexes an.

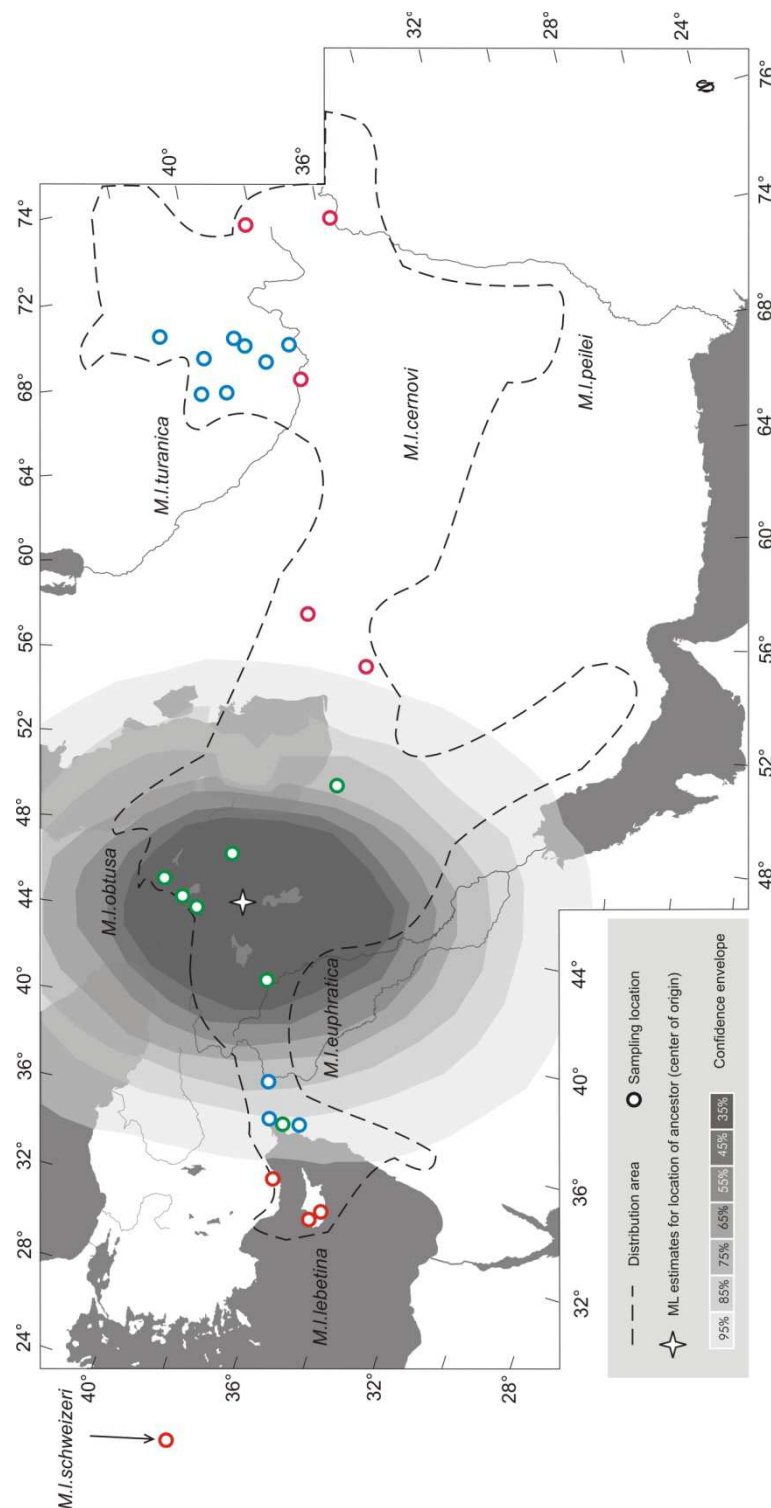


Abbildung 32: Maximum-Likelihood-Berechnung zum geographischen Ursprung von *Macrovipera lebetina* (Datensatz 2566). Kleine offene Kreise zeigen die Fundorte des Probenmaterials. Die grau schattierte Kontur illustriert eine Likelihood-Oberfläche unter der Annahme eines Zusammenhangs zwischen phylogenetischer und geographischer Distanz. Die Konturen repräsentieren verschachtelte Konfidenzintervalle in 10%-Abstufungen (äußere hellgraue Kontur 95%, innere dunkelgraue Kontur 35%). Alle Orte außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls sind signifikant schlechter als der Maximum Likelihood-Wert im Zentrum der Oberfläche (weißer Stern). Gestrichelte Linien markieren das Verbreitungsareal von *Macrovipera lebetina*.

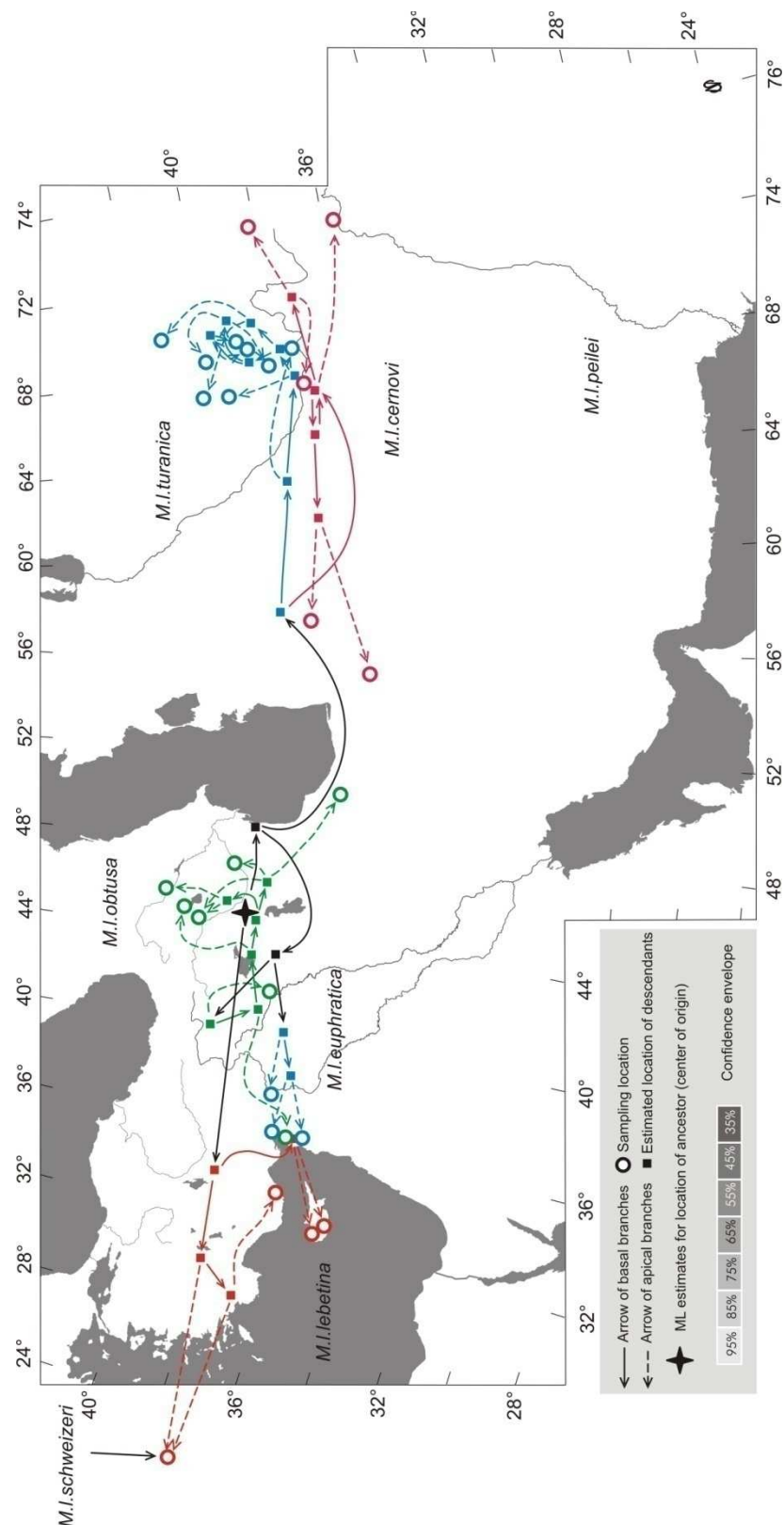


Abbildung 33: Maximum-Likelihood (ML)-Migrationsrouten für die Vorfahren von *Macrovipera lebetina* (Datensatz 2566). Pfeile geben die Migrationsrichtung an, indem sie vom Ort des Vorfahren zum Ort des Nachfahren zeigen. Durchgezogene Pfeile verbinden basale Populationen interner Knoten (Quadrate), während gestrichelte Pfeile auf die Fundorte rezenter Populationen zeigen. Der Stern zeigt den ML-Ursprung von *Macrovipera lebetina* an.

Abbildung 33 zeigt, wie sich eine Stammgruppe von *Macrovipera lebetina* vom Zentrum des Ursprungs nordöstlich des Urmiasees nach Westen ausbreitete und die Mittelmeerinseln Zypern und die Kykladen (*lebetina*-Stamm) kolonisierte. Die zweite Stammgruppe migrierte zunächst gen Osten und teilte sich hier in zwei Linien, deren eine nach Mittelasien vordrang (mittelasiatischer Stamm), während die andere erneut gen Westen wanderte (anatolischer Stamm). Mit dem Vordringen nach Mittelasien und der Besiedlung neuer Lebensräume kam es zur Aufspaltung in zwei Linien, die durch zwei Subspezies repräsentiert werden. *Macrovipera lebetina turanica* verbreitete sich im Tien-Shan bis zum Katorkuhhoi-Gebirge und die *M. l. cernovi* konnte freie Nischen in den südlich gelegenen Gebirgen vom Pamir über den Hindukusch bis zum Kopet Dag besetzen.

### 8.2.2 Populationsdemographie

Signifikanztests für Ramos-Onsins und Rozass Statistik ( $R_2$ ), Harpendings Raggedness Index Statistik ( $R_i$ ) und Fus Statistik ( $F_s$ ) können keinen Unterschied zur Nullhypothese (konstante Populationsgröße) nachweisen (siehe Tabelle 18). Die Wahrscheinlichkeitswerte liegen für alle Tests oberhalb des Signifikanzniveaus ( $p > 0,05$ ). Unter allen vier getesteten Gruppen zeigt *M. wagneri* am ehesten die Tendenz zur Populationsexpansion. Die Tendenz wird durch Mismatch-Verteilungen (Abbildung 34) gestützt. Erwartete und beobachtete paarweise Sequenzunterschiede der eingipfligen Verteilung sind nur bei *M. wagneri* deckungsgleich und können als Indiz für eine sich panmiktisch fortpflanzende Population gelten, die ihr Verbreitungsareal plötzlich ausgedehnt hat. Die Verteilungen der anderen phyletischen Gruppen (*bornmuelleri*, *bulgardaghica* und *xanthina*) sind stark mehrgipflig und weichen deutlich von der erwarteten Verteilungskurve unter Annahme einer Populationsexpansion ab. Die rezenten Populationen von *bornmuelleri*, *bulgardaghica* und *xanthina* sind fragmentiert und/oder im Begriff des Rückganges.

Tabelle 18: „Summary Statistics“ und Tests auf Populationsexpansion für ausgewählte *Montivipera* Kladen des Datensatzes 2566, berechnet mit dem Programm DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009). Anzahl der Proben (n), Anzahl Haplotypen (h), Haplotypendiversität (Hd), Ramos-Onsins und Rozass Statistik ( $R_2$ ), Harpendings raggedness index Statistik ( $R_i$ ), Fus Statistik (FS) und verwendete Evolutionsmodelle für die Bayesian Skyline Analyse (BSP). Signifikanz-Tests für Coalsecent-Simulationen  $R_2$ ,  $R_i$  und  $F_s$  wurden mit 10.000 Wiederholungen durchgeführt. Kein statistischer Test weicht signifikant (alle  $p > 0,05$ ) von der Nullhypothese einer konstanten Populationsgröße ab.

Klade	Locus	Sequenzlänge	n	h	Hd	$R_2$ (p)	$R_i$ (p)	$F_s$ (p)	Evol.modell (BSP)
<i>M. bornmuelleri</i>	COI, Cytb, Nd5	2567	5	3	0,8	0,300 (0,891)	0,2800 (0,685)	4,574 (0,068)	GTR,GTR,HKY
<i>M. bulgardaghica</i>	COI, Cytb, Nd5	2567	15	10	0,924	0,156 (0,710)	0,0655 (0,855)	2,250 (0,838)	HKY+I,GTR,HKY+I
<i>M. wagneri</i>	COI, Cytb, Nd5	2567	13	4	0,756	0,190 (0,691)	0,0656 (0,109)	0,361 (0,601)	HKY,HKY,HKY
<i>M. xanthina</i>	COI, Cytb, Nd5	2567	35	19	0,941	0,158 (0,934)	0,0136 (0,904)	8,952 (0,995)	GTR+I,GTR+G,GTR+G

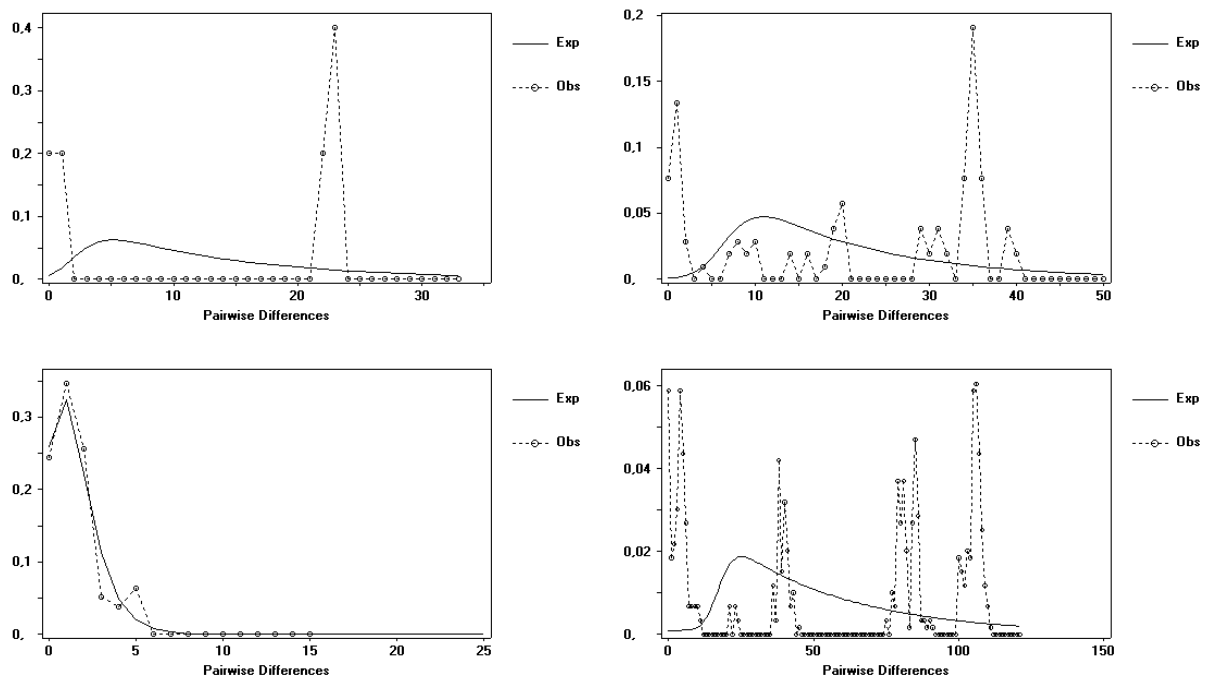


Abbildung 34: Mismatch-Verteilungen (paarweise Sequenzunterschiede) ausgewählter *Montivipera*-Kladen auf Grundlage von drei mt-Genen (Datensatz 2566), berechnet mit dem Programm DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009). *Montivipera bornmuelleri* (oben links), *M. bulgardaghica* (oben rechts), *M. wagneri* (unten links) und *M. xanthina* (unten rechts). Exp = erwartete Mismatch-Verteilung unter Annahme einer Populationsexpansion, Obs = beobachtete Mismatch-Verteilung.

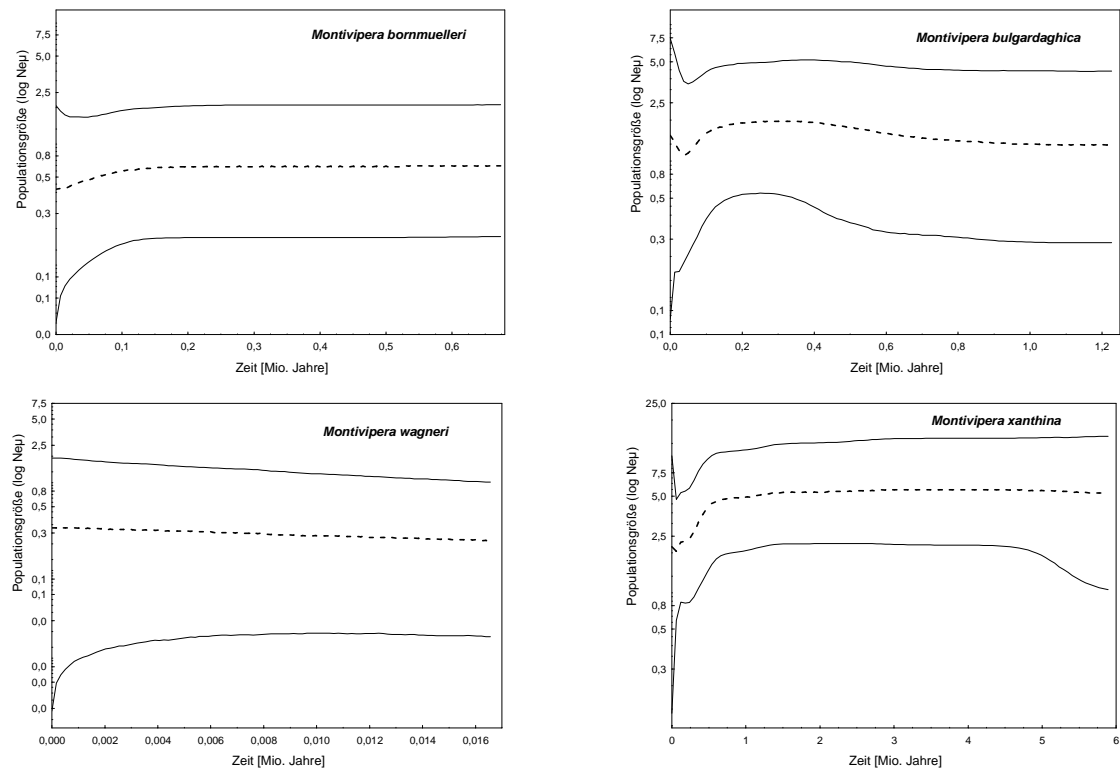


Abbildung 35 (vorherige Seite): Effektive Populationsgröße ( $\log N_{\text{eff}}$ ) ausgewählter *Montivipera*-Gruppen des Datensatzes 2566 im Verlaufe der Zeit (Mio. Jahre). Bayesian Sky Line Plots wurden mit dem Programm BEAST v1.6.1 (Drummond and Rambaut 2007) und unter Annahme einer strikten Evolutionsrate von 0,0043/Mio. Jahren berechnet. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die 95%-Konfidenzintervalle und die gestrichelte Linie den Mittelwert der effektiven Populationsgröße.

Die Rekonstruktion der historischen, effektiven Populationsgröße (Abbildung 35) zeichnet ein äquivalentes Bild. Während die Populationsgröße ( $N_{\text{e}}$ ) der Wagners Bergotter seit den letzten 160tausend Jahren stetig angestiegen ist, haben sich die Populationsgrößen von *bornmuelleri*, *bulgardaghica* und *xanthina* durch Klimaschwankungen und vertikale Habitatverschiebungen zu unterschiedlichen Phasen des Pleistozäns verändert.

### 8.3 Diskussion

Der überwiegende Teil der rezenten Liniendiversität von *Monti-* und *Macrovipera* geht auf die erdgeschichtlichen Zeitabschnitte des Pliozäns und Pleistozäns zurück. Avise et al. (1998) berechneten, dass 57% der rezenten Herpetofauna auf pleistozäne Artbildungsprozesse zurückzuführen sind.

Artengefüge und Verbreitungen wurden im Zuge epochaler Klimaveränderungen des Pliozäns und Pleistozäns verändert (z.B. Svenning et al. 2009). Die Transition von Miozän zu Pliozän korreliert mit einer globalen Abkühlung (Dowsett & Poore 1991, Mudelsee & Raymo 2005, Raymo et al. 2006, Lisiecki & Raymo 2007), der polaren Gletscherexpansion (Zachos 2001) und Etablierung eines Jahreszeitenklimas mit saisonalen Unterschieden (z.B. Mosbrugger et al. 2005). Der Klimawechsel führte zu einem gravierenden ökologischen Turnover unter tropischen Arten (Svenning 2003, Svenning et al. 2009). In dem Zeitfenster des späten Pliozäns begann die Entwicklung des mediterranen Klimas bis zu seiner vollen Etablierung vor 2,8 Mio. Jahren (Suc 1984).

Im Übergang von Pliozän zu Pleistozän stellten Glaziale lediglich kühlere Zeitabschnitte dar, die zum späten Pleistozän deutlich kälter und trockener wurden (Bottema & van Zeist 1981, Nemec & Kazanci 1999, Roberts & Wright 1993). Im Pleistozän setzte sich die globale Abkühlung fort und die nördliche Hemisphäre wurde einem zyklischen Wechsel von Kalt- und Warmzeiten unterworfen. Für annähernd 2 Mio. Jahre hatten die Eiszeiten der nördlichen Hemisphäre eine Periodizität von 41 ka (Lisiecki & Raymo 2007, Ruddiman 2006). Im Mittleren Pleistozän (0,92 bis 0,65 Mio. Jahre) führte eine drastische Orbitalveränderung zur Transition (MPT<sup>7</sup>) der Periodizität (Shackleton & Opdyke 1976,

<sup>7</sup> MPT=Mid-Pleistocene-Transition 0.92 bis 0.65 Mio. Jahre (Shackleton & Opdyke 1976; Mudelsee & Schulz 1997)



Mudelsee & Schulz 1997) und verschob die Glazial-Interglazial-Perioden von einer 41 ka Amplitude zu einer Langfrequenzamplitude von 100 ka (Pisias & Moore 1981).

Der periodische Wechsel von Kalt- (Glaziale) und Warmzeiten (Interglaziale) hatte drastische ökologische Konsequenzen, die die Biodiversität nachhaltig beeinflussten. Dynamische Veränderungen der Makrohabitate führten zu antagonistischen Reaktionen im Tier- und Pflanzenreich (z.B. Varga & Schmitt 2008). Während Profiteure ihre Lebensräume expandierten, wurden andere Organismen in ihren Arealen regressiv fragmentiert oder starben aus. Brachte der Klimawandel günstigere Lebensraumbedingungen, so wurden Areale von einem Refugium ausgehend rekolonisiert. Squamaten sind aufgrund ihres poikilothermen Stoffwechsels in nördlichen Breitenlagen nur bedingt anpassungs- und überlebensfähig. Glaziale Kaltzeiten überdauerten sie daher in mediterranen Refugialräumen (z.B. Weiss & Ferrand 2007, Joger et al. 2007, Bhagwat & Willis 2008), davon zeugt die hohe Artenvielfalt in den südlichen Regionen Europas.

In historischer Zeit abgelagerter Blütenstaub ermöglicht uns heutzutage tiefe Einblicke in das Vegetationsbild und das Klima vergangener Epochen. Obwohl die wenigen gut untersuchten Pollenlagerstätten des Vorderen Orients keine vollständige Rekonstruktion der Paläovegetation ermöglichen, kann mithilfe von stratigraphisch gut dokumentierten Fundstellen aus dem östlichen Mittelmeerraum ein realitätsnahes Abbild historischer Zeit erzeugt werden (siehe Bar-Yosef & Belmaker 2010). Der vordere Orient und hier insbesondere die Levante sind der Korridor für die Ausbreitung und Eroberung Eurasiens durch den Menschen gewesen (Bar-Yosef & Belfer-Cohen 2001, van Andel et al. 2003, Mellars 2006). Die Paläoanthropologie hat daher in jüngster Zeit ihr Augenmerk auf die vorzeitlichen klimatischen und ökologischen Bedingungen entlang der Levante gerichtet (z.B. Müller et al. 2011), mit deren Hilfe das steinzeitliche Vegetationsbild rekonstruiert werden kann.

In Übereinstimmung aller Pollenlagerstätten korreliert die Aufeinanderfolge der Pflanzengesellschaften mit dem Wandel des Klimas. Äquivalente Sukzessionsstadien treten während des Frühen bis Mittleren Pleistozäns mit 41 ka Intervall in einer Periodizität von 23 ka auf (Tzedakis 2007). Pollenspektren aus unterschiedlichen Regionen des Vorderen Orients (Shamb Armenien (Joannin et al. 2010), Dmanisi Georgien (Messenger et al. 2008), Urmia-See Iran (Djamali et al. 2008), Bitzat Ruhama Israel (Zaidner 2003b)) und Osteuropa (Tenaghi Philippon Griechenland (Tzedakis et al. 2006)) stimmen in ihrem generellen Trend überein und weisen ausgeprägte Steppenfloren während der Glazialstadien und die Dominanz von Hartlaubgehölzen und sommergrünen Wäldern in Interglazialen auf (Bar-Yosef & Belmaker 2010). Eine Übersicht zu historischen Pollenlagerstätten findet sich bei Cordova et al. (2009).

Für die Identifizierung von phylogeographischen Strukturen sind mt-Gene besonders geeignet, weil sie eine breite Zeitspanne von tiefen, bis hin zu rezenten jungen evolutionären Ereignissen (intraspezifische Phylogruppen) abdecken (siehe Avise 2009). Um die Güte einer phylogeographischen Struktur zu beurteilen, entwickelten Avise & Ball (1990) vier Konkordanz-Kriterien (-Konzepte): 1) Genealogische Konkordanz ist gegeben, wenn in einem Sequenzdatensatz mehrere Nukleotidsubstitutionen ein- und denselben geographischen Haplotyp bilden. 2) Multi-Lokus-Konkordanz äußert sich dadurch, dass verschiedene Gene dieselbe genetische Architektur identifizieren. 3) Multi-Spezies-Konkordanz ist ein biogeographisches Konzept und bedingt zwischen verschiedenen ko-verbreiteten Arten die gleichen Phylogruppen. 4) Von Multipler-Kategorien-Konkordanz spricht man, wenn Genealogien durch unabhängige Belege aus Morphologie, Taxonomie oder Geomorphologie bestätigt werden.

Die Phylogruppen der Gattungen *Macro-* und *Montivipera* erfüllen die Kriterien der genealogischen Konkordanz. Ihre räumliche Verteilung ergibt sinnvolle biogeographische Gruppen (vollständiges Lineage-Sorting), die plausibel erklärbar und statistisch nachweisbar sind. So bestätigt der Phylogeographic-Association-Test (Lemmon & Moriarty Lemmon 2008) für alle getesteten Phylogruppen der Gattungen *Macro-* und *Montivipera* einen signifikanten Zusammenhang zwischen Genealogie und geographischer Distanz.

Konkordanz zwischen Kern- und mt-Genen lässt sich für keinen Datensatz nachweisen, wenngleich die westanatolischen Bergottern Ansätze von Multipler-Kategorien-Konkordanz erkennen lassen.

In den nachfolgenden Abschnitten soll versucht werden, die Haplotypen-Verbreitung und historische Populationsdemographie der orientalischen Vipern unter besonderer Berücksichtigung der anatolischen Bergottern (*Montivipera xanthina*- und *M. bornmuelleri*-Komplexe) biogeographisch zu erklären.

#### 1) *Montivipera*

Der Ursprung rezenter anatolischer Bergottern (MRCA) liegt im anatolischen Hochland (Abbildung 30) und kann auf einen Zeitraum zwischen 5,4 Mio. Jahre (BEAST, Abbildung 23) und 6,2 Mio. Jahre (PhyloBayes, Abbildung 15) fixiert werden. Das Zeitfenster korreliert stark mit zwei exogenen (abiotischen) Faktoren, die möglicherweise die Radiation initiiert haben. 1) Die Klima-Transition von Miozän zu Pliozän mit globaler Abkühlung (Dowsett & Poore 1991, Mudelsee & Raymo 2005, Raymo et al. 2006, Lisiecki & Raymo 2007), während derer in Mitteleuropa die Jahresdurchschnittstemperaturen und -niederschläge drastisch abnahmen und sich ein Klima mit ausgeprägter Saisonalität entwickelte

(Mosbrugger et al. 2005). 2) Vor dem Wechsel zum Jahreszeitenklima herrschte in Europa ein warm-feuchtes Klima (Mosbrugger et al. 2005, Salzmann et al. 2008). Folglich war das Gros des Arten-Pools dieser Zeit subtropischen Bedingungen angepasst. Die Prä-Adaptation rezenter *Montivipera*-Linien an ausgeprägte Jahreszeitenklimata geht auf ein tektonisches Ereignis zurück. Im späten Miozän-Pliozän wurde das türkisch-iranische-Plateau um 1,5 - 2 km angehoben (Şapaş & Boztepe-Güney 2009), infolgedessen sich ein typisches, kühleres Gebirgsklima entwickelte.

Der Vordere Orient verfügt auf engstem Raum über eine ausgesprochen hohe geographische Heterogenität, die einen starken Einfluss auf die Biogeographie und Evolution von Gebirgsarten hat (vergl. Schmitt 2009). Topographische Heterogenität ist ein Impetus für die Speziation. Svenning et al. (2009) nennen dafür drei topographisch bedingte Faktoren: 1) eine größere Habitatdiversität, 2) eine höhere historische Wahrscheinlichkeit der allopatrischen und parapatrischen Speziation und 3) eine geringere Aussterbewahrscheinlichkeit durch die Möglichkeit, Areale regional in der Höhe zu verschieben.

Das Zusammenspiel aus topographischer Heterogenität und historischen Klimaschwankungen stellt die Triebkräfte der Bergotter-Radiation.

## II) Ostanatolische Bergottern

Die ostanatolischen Bergottern der Gattung *Montivipera* (*bornmuelleri*, *bulgardaghica*, *albizona*, *wagneri*) sind in ihrer heutigen Verbreitung strikt auf die oro-mediterrane Gebirgszone (1200-2200 m ü NN) unterhalb der Dornpolstergesellschaften (Astragalo-Brometalia) beschränkt, die im Taurus und der Levante von *Cedrus-Abies*-Wäldern (Querco-Cedretalia libani) dominiert werden (Parolly 2004). Nach heutigem Kenntnisstand gibt es keinen Fundort unterhalb von 1400 m ü NN (Schätti et al. 1991), der lokale Anpassung an abweichende ökologische Bedingungen dokumentiert. Die geringe ökologische Reaktionsbreite scheint die rezenten phyletischen Linien in ihrer potentiellen Ausbreitung zu beschränken.

Aufgrund des phylogenetischen Nischenkonservatismus kann man davon ausgehen, dass der letzte gemeinsame Vorfahre (MRCA) der ostanatolischen Bergottern einen ähnlichen Nischenraum besetzte. Wenngleich die Stammart immer eine ähnliche Vegetationszone bewohnte, änderte sich ihre historische Höhenverbreitung in Abhängigkeit von pleistozänen Klimaänderungen. Vegetationsstufen werden durch den Verlauf der Schneegrenze limitiert, die die ganzjährig schneebedeckten von den im Sommer schneefreien Gebieten trennt. Der

Verlauf der Schneegrenze ist ein geeignetes und anschauliches Indiz zur Rekonstruktion der Paläoverbreitung von Gebirgsarten.

In Abhängigkeit von orographischen und klimatischen Faktoren liegt die Schneegrenze in der Türkei heutzutage zwischen 2900m (Giresun Dağları) und 4300m ü NN (Ağrı Dağı) (Kurter 1991). Bedingt durch die großen Höhen des Taurus weisen seine südöstlichen Gebirge (Güneydoğu Toroslar) gegenwärtig die höchste Gletscherdichte in der Türkei auf (Kurter 1991). Geomorphologische Untersuchungen zeigen, dass die Schneegrenze in der Türkei während der Würmkaltzeit um ca. 1000 m unterhalb der heutigen Schneegrenze lag (Messerli 1964). Das Absinken der LGM<sup>8</sup>-Temperaturen von 10-12 °C im anatolischen Hochland (Robinson et al. 2006) hatte eine massive Vergletscherung der Gebirge zur Folge (siehe auch Sarıkaya et al. 2009 und Zitate), während sich die unmittelbare Nähe zum Mittelmeer mildernd auf die Küstentemperaturen auswirkte (Jones et al. 2007, Enzel et al. 2008).

Rezente Populationen von *Montivipera bulgardaghica* bewohnen heutzutage im Taurus eine Höhenstufe von 1450 bis 2700 ü NN (Schätti et al. 1991, Nilson & Andrén 1986a). Damit liegt die Höhenverbreitung im Taurus ca. 800 m unterhalb der Schneegrenze (Orta Toroslar 3450 m ü NN, Güneydogu Toroslar zwischen 3600-3500 m ü NN (Kurter 1991)). Rekonstruiert man mit dem Wissen über die ökologischen Lebensraumansprüche rezenter Populationen die Höhenverbreitung während des Würmglazials (LGM), so dürfte die obere historische Verbreitungsgrenze im Taurus zwischen ca. 1650 und 1800 m ü NN gelegen haben.

Die zyklische Verschiebung der Schneefallgrenze während des Pleistozäns hatte demnach einen gravierenden Einfluss auf die Ausbreitung und Isolierung von Populationen in Raum und Zeit, vergleichbar mit der Fragmentierung alpiner Arten in Europas Hochgebirgen (vergl. Varga & Schmitt 2008).

Das heutige Verbreitungsbild zeigt die ostanatolischen Berggottern als Bewohner eines disjunkten Areales (Nilson & Andrén 1986a, Nilson et al. 1990). Weiträumige Ebenen und Täler des anatolischen Plateaus und der Levante trennen die isolierten Hochgebirgslebensräume des Taurus (*bulgardaghica*) von den Kulmaç-Dağları (*albizona*), den Karasu-Aras-Dağları (*wagneri*) und den Gebirgen des Libanon und Anti-Libanon (*bornmuelleri*).

Dieses Argument greifen auch Nilson et al. (1990) auf, um die Evolution der Taxa *bulgardaghica*, *bornmuelleri*, *albizona* und *wagneri* durch Vikarianz zu erklären. Dabei heben die Autoren die Bedeutung der anatolischen Diagonalen hervor, die Kleinasien in

---

<sup>8</sup> LGM=Letztes-Glazial-Maximum

eine westliche und eine östliche Flora und Fauna trennt. Nach Nilson et al. (1990) war die anatolische Diagonale gleichzeitig Brücke und Hindernis für die Ausbreitung der Herpetofauna: „We hypothesize that the dispersal of an ancestor along the „Diagonal“ resulted in the speciation of isolated populations due to vicariance events.“ (Nilson et al. 1990, S. 286).

Nilson et al. (1990) erkannten die Bedeutung der allopatrischen Speziation für die Diversität rezenter Bergotterpopulationen, konnten zu dem damaligen Zeitpunkt die phylogeographischen Zusammenhänge mit Hilfe morphologischer Daten jedoch nicht erfassen. Erst die molekulargenetische Analyse der Bergotter-Populationen bietet die Möglichkeit eines tiefen Einblickes in den Prozess der historischen Diversifikation. Für die Interpretation der Daten ist das Konzept des phylogenetischen Nischenkonservatismus (Ricklefs & Latham 1992, Peterson et al. 1999, Webb et al. 2002) und dessen Bedeutung für die allopatrische Speziation (Wiens 2004) entscheidend.

Nach traditioneller Auffassung sind natürliche Selektion, Anpassung und ökologische Spezialisierung die treibenden Faktoren für die Aufspaltung von Linien (vergl. Wiens 2004).

Nach Wiens (2004) sind Arten jedoch bestrebt, ihre ancestrale ökologische Nische beizubehalten. Seiner Argumentation folgend, verhindern vier Faktoren die lokale Anpassung: fehlende Anpassungsfähigkeit, natürliche Selektion, Pleiotropie und Genfluss. Natürliche Selektion benachteiligt lokale Anpassungen an neue ökologische Bedingungen, weil die Fitness außerhalb der ancestralen Nische reduziert ist (Holt & Gaines 1992, Holt 1996). Genetische Mechanismen wie die Pleiotropie, bei der ein Gen auf zwei unabhängige Merkmale (z.B. Fekundität und Anpassungsfähigkeit) einwirkt, können sich als Trade-off negativ auf die Evolution von Adaptation auswirken. Überdies kann Genfluss zwischen dem Zentrum des Verbreitungsgebietes und seiner Peripherie lokale Anpassungen an neue Lebensräume erschweren. Das Zusammenwirken aller Faktoren verhindert lokale Anpassungen an abweichende Lebensraumbedingungen in der Arealperipherie.

Die rezente phylogeographische Struktur der ostanatolischen Bergottern ist ein Paradebeispiel für allopatrische Speziation durch phylogenetischen Nischen-Konservatismus. Dafür spricht, dass es nach heutigem Kenntnisstand keiner rezenten Population gelungen ist, sich neuen ökologischen Bedingungen anzupassen und die ancestrale ökologische Nische zu verlassen (keine Kulturfolger und keine Vorkommen außerhalb der oro-mediterranen Gebirgszone!). Divergenzzeitberechnungen zu Folge (siehe Kapitel 6) hat die Kladogenese rezenter phyletischer Linien im Pleistozän stattgefunden, und nährt die Hypothese der allopatrischen Speziation durch phylogenetischen Nischenkonservatismus. Abbildung 36 illustriert, wie die Klimaschwankungen im

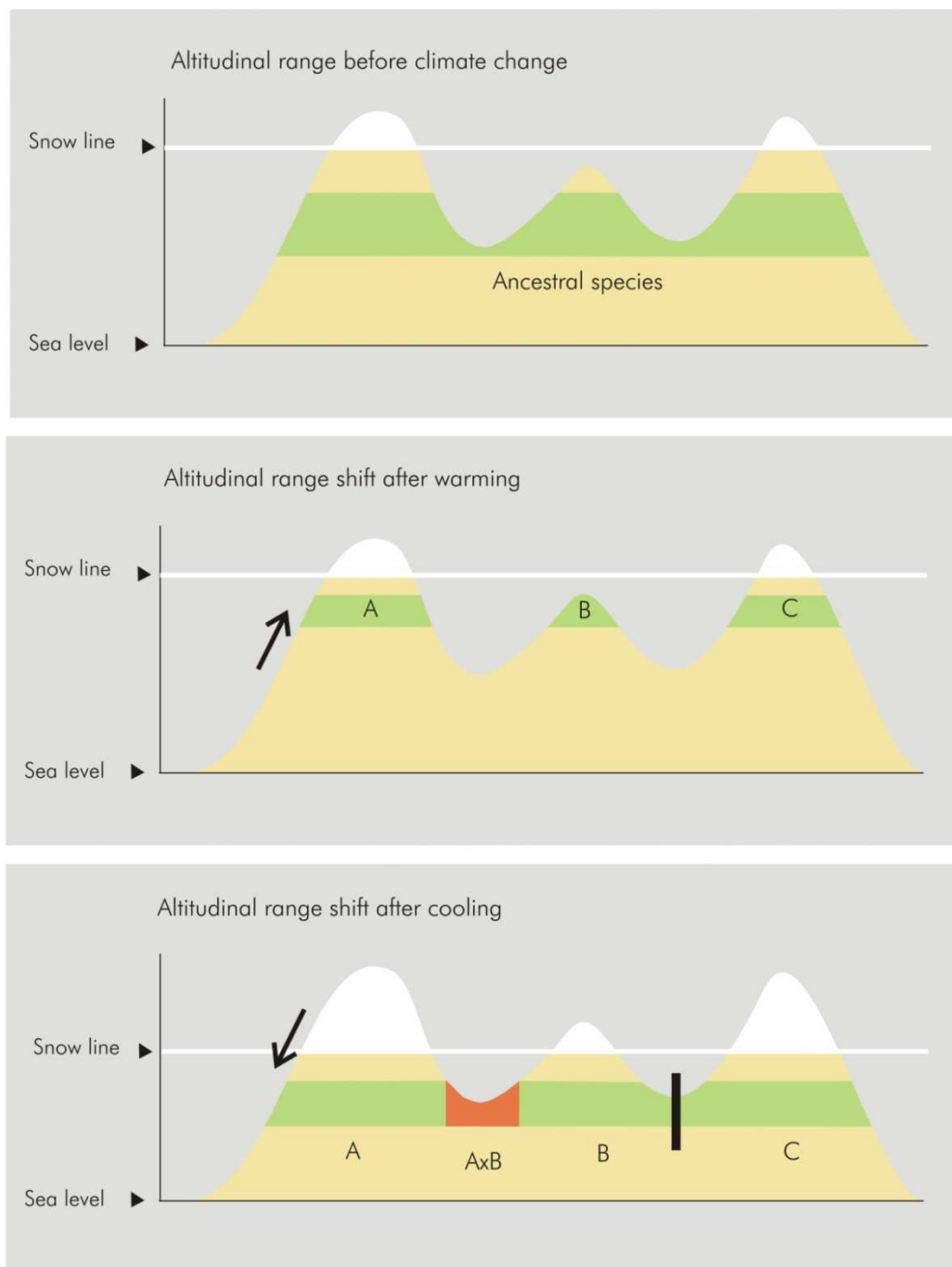


Abbildung 36: Phyletischer Nischenkonservatismus und allopatrische Speziation, verändert nach Wiens (2004, Seite 195, Abb. 1). Die Abbildung illustriert die Entstehung allopatrischer Berggottern-Linien (*Montivipera*) im anatolischen Hochland, forciert durch Klimaschwankungen im Pleistozän. Eine ancestrale Stammart bewohnt eine bestimmte Höhenzone, deren Grenzen durch intrinsische und extrinsische Faktoren gegeben sind (oben). Durch eine interglaziale Klimaerwärmung verschiebt sich die ökologische Zone in größere Höhen, in deren Folge die zuvor panmiktische Population fragmentiert wird (Mitte). In der räumlich und genetisch isolierten Lage bilden sich allopatrische Linien, die nach erneuter Klimaabkühlung wieder miteinander in Kontakt treten können und Erbgut untereinander austauschen (unten AxB), oder es kam zur Etablierung reproduktiver Barrieren (Speziation), die einen Genaustausch verhindern.

Pleistozän die treibende Kraft für die Divergenz heutiger Linien waren. Allopatrische oder parapatrische Speziation durch geographische Isolation und Evolution in situ sind ein Phänomen aller Gebirge (vergl. Schmitt 2009). Generell gilt für Gebirgsarten, dass unter Einfluss einer Klimaerwärmung Lebensräume zwangsläufig schrumpfen, weil die Verschiebung der ökologischen Zonierung in die Höhe zur Abnahme der effektiven Oberfläche führt (Abbildung 36 Mitte). Die europäische Fauna liefert dafür eine Reihe von Beispielen aus allen Tiergruppen. Im Umkehrschluss gilt, dass sich in Glazialen die montan bis subalpine Vegetationsstufe abwärts bewegt und sich dadurch in der Fläche ausdehnt (Abbildung 36 oben). Unter der Annahme, dass Kolonisierung und Expansion der Populationen nie in Interglazialen mit maximaler Erderwärmung stattfanden, sollte die effektive Populationsgröße in Kaltphasen eher expandieren und sich während Warmphasen durch genetische Isolation differenzieren. Die Vorhersagen lassen sich jedoch nicht oder nur bedingt durch die Rekonstruktion der Populationsdemographien bestätigen, weil die Annahme nur auf der Verschiebung von Temperaturzonen fußt und andere Klimafaktoren unberücksichtigt bleiben. Für die Ausdehnung einer Vegetationszone, wie den *Cedrus-Abies*-Wäldern (*Querco-Cedretalia libani*), ist nicht nur an eine bestimmte Temperaturzone, sondern auch an bestimmte Niederschlagsmengen und Bodeneigenschaften gebunden. In geologischen Zeiträumen hat das Klima im Vorderen Orient drastischen, für die Biota folgenschweren Schwankungen unterlegen (Robinson et al. 2006).

Pollenanalysen aus Bitzat Ruhama in der nördlichen Negev-Wüste zeigen, dass sich im frühen Paläolithikum (2,5-0,3 Mio. Jahre) drastische Transitionen der Vegetationszonen ereigneten. Zaidner 2003 (Zit. in Bar-Yosef & Belmaker 2010) fand in den Pollenspektren des nur 200 m ü NN gelegenen Fundortes Blütenstaub der Gattung *Cedrus*, die als Zeigerpflanzen der oro-mediterranen Vegetationsstufe gelten. Eine Ausdehnung des Zederngürtels, wie er in der Negev-Wüste nachgewiesen wurde, war sicherlich kein lokales Ereignis, sondern hat sich in äquivalenten Zonen entlang der gesamten östlichen Mittelmeerküste erstreckt und hat so den potentiellen Lebensraum des MRCA der ostanatolischen Berggottern erweitert.

Die Stammart (MRCA) der ostanatolischen Berggottern evolvierte vor ca. 2,8 Mio. Jahren in Anatolien und konnte mit dem Einsetzen der weltweiten Klimaabkühlung zum Ende des Pliozäns entlang der Levante bis in das Gebiet des heutigen Libanons vordringen (siehe Abbildung 31). Die Divergenzzeiten und das Ausbreitungs-Szenario entlang der Levante korrelieren mit der abrupten Klimaabkühlung zu Beginn der Plio-Pleistozänen Klimatransition, die vor 2,7-2,5 Mio. Jahren (Lisiecki & Raymo 2007) einsetzte. Nach der Kolonisierung der Levante wurde das Areal der Stammart ostanatolischer Berggottern im

späten Pliozän oder frühen Pleistozän fragmentiert und der MRCA von *M. bornmuelleri* in der Levante isoliert. In dem gesamten nachfolgenden Zeitraum des Pleistozäns und Holozäns erlaubten die klimatischen Bedingungen zu keinem Zeitpunkt eine Rekolonisierung Anatoliens durch die endemischen Vorfahren der heutigen *M. bornmuelleri*. Dass die ökologische Isolierung möglich war, zeigen Untersuchungen von Hartman (2011), der für das Mittlere Pleistozän stabile und unveränderte klimatische Bedingungen in den Golanhöhen nachwies.

Divergenzzeitberechnungen zufolge setzte die Differenzierung der Stammart von *wagneri*, *bulgardaghica* und *albizona* erst deutlich später ein. Der MRCA besiedelte vermutlich das ostanatolische Hochland, bis sich die phyletische Linie *M. wagneri* vor 1,8 Mio. Jahren abtrennte.

Pollenstratigraphien aus Shamb in Armenien (Joannin et al. 2010) – keine 120 km vom nächsten rezenten *M. wagneri* Fundort entfernt – lassen auf eine mosaikartige Vegetationsstruktur im Früh- bis Mittelpleistozän (1,33-1,08 Mio. Jahre) aus mesothermen Baum- und Steppengesellschaften schließen. Während der Interglaziale breiteten sich mesotherme Wälder aus, die während der Glaziale wieder stark zurückgedrängt wurden. In der Transition zu Kaltzeiten entwickelten sich jedoch keine kältetoleranten Gebirgswälder. Im Unterschied zu anderen mediterranen Fundstätten war die Steppenflora während der Interglaziale fester Bestandteil des Vegetationsbildes (siehe Zitate in Joannin et al. 2010), das bestätigen auch Pollenuntersuchungen aus den benachbarten Lagerstätten Dmanisi (Georgien, 1,922-1,775 Mio. Jahre, Messager et al. 2008) und dem Urmia-See (Iran, Djamali et al. 2008). Die Paläovegetation der Interglaziale des Früh- bis Mittelpleistozäns ähnelte stark der des heutigen Vegetationsbildes.

Die geringe genetische Divergenz rezenter *M. wagneri*-Haplotypen ist ein Anzeichen ihres jungen evolutionären Alters. Populationsdemographische Signaturen bezeugen einen stetigen Anstieg der Populationsgröße in den letzten 165 ka, (Bayesian-Sky-Line-Plot) oder einen sprunghaften Anstieg der Population (Mismatch-Distribution). Überraschenderweise wurde die demographische Entwicklung nach dem Bayesian-Sky-Line-Plot nicht durch Glazial/Interglazialphasen beeinträchtigt. Über den Zeitraum von 165 ka schienen die Populationen ähnlichen ökologischen Bedingungen ausgesetzt gewesen zu sein. Das rezente Verbreitungsgebiet von *M. wagneri* erstreckt sich auf das Einzugsgebiet des Aras-Flusses (Joger et al. 1988), der zum Kaspischen Meer hin entwässert. Geomorphologische Gegebenheiten des Flussverlaufes und seines Einzugsgebietes ermöglichten wahrscheinlich eine schnelle räumliche Verlagerung der Lebensräume in historischer Zeit ohne Hindernisse.



Die historischen Populationsgrößen ( $N_e$ ) von *M. bornmuelleri* und *M. bulgardaghica* nehmen im Verlauf der Würm/Weichsel-Eiszeit (nach dem Eem Interglazial vor 124-119 ka) einen negativen Verlauf. Rekonstruktionen der Paläovegetation im östlichen Mittelmeerraum für den Zeitraum der letzten Eiszeit beweisen die Dominanz von trockenresistenten Steppenfloren, die nur kurzzeitig von interstadialen Warmphasen und der Ausbreitung von Baumgesellschaften unterbrochen war (Müller et al. 2011). Überdies zeigen die Untersuchungen, dass der limitierende Faktor für die Ausbreitung von Baumgesellschaften in dem ägäischen Raum nicht die Temperatur, sondern der fehlende Niederschlag war.

Der Zusammenhang zwischen dem Rückgang der Bergotterpopulationen ( $N_e$ ) während der letzten Eiszeit und der Ausbreitung von Steppen ist naheliegend und plausibel. Während die Populationsgröße von *M. bornmuelleri* bis zum Holozän stetig sank, wurde der Negativtrend bei *M. bulgardaghica* vor 41 ka gestoppt und entwickelte sich seither bis ins Holozän positiv. Der Wendepunkt in der Populationsdemographie korreliert erstaunlich gut mit einer interstadialen Warmphase der Würm/Weichsel-Eiszeit, in der sich immergrüne *Quercus*- und *Pinus*-Wälder im östlichen Mittelmeerraum ausdehnten (Müller et al. 2011) und den Anstieg der Humidität dokumentieren.

Der Rückschluss, dass die steigenden Niederschläge und die zurückweichende Steppenvegetation neue Ressourcen und Lebensräume schufen und so die Populationsgrößen zunahmen, scheint plausibel.

Die Aufspaltung des MRCA in die nominellen Taxa *M. bulgardaghica* und *M. albizona* vor 1,3 Mio. Jahren ist mit der Kolonisierung neuer Habitate verbunden, die jedoch zunächst nicht zum Anstieg der effektiven Populationsgröße führt. Die Rekonstruktion der Migrationsrouten mit dem Programm Phylomapper (Lemmon & Moriarty Lemmon 2008) zeigt – wie von Nilson et al. (1990) vermutet – eine Ausbreitung entlang der anatolischen Diagonale.

Die Signatur der historischen Populationsdemographie weist auf einen Anstieg der  $N_e$  im Mittleren Pleistozän hin (ca. 460 ka). Direkte biogeographische Belege für den Anstieg der  $N_e$  lassen sich nicht finden. Der entsprechende Zeitraum war durch drastische Orbitalveränderungen geprägt. Für annähernd 2 Mio. Jahre hatten die Eiszeiten der nördlichen Hemisphäre eine Periodizität von 41 ka (Lisiecki & Raymo 2007, Ruddiman 2006). Eine globale Transition (MPT) veränderte zwischen 0,92 bis 0,65 Mio. Jahren (Shackleton & Opdyke 1976, Mudelsee & Schulz 1997) die Glazial-Interglazial Perioden von einer 41 ka Amplitude zu einer Langfrequenzamplitude von 100 ka (z.B. Pisias & Moore 1981). Entscheidender war möglicherweise der mehrfache Wechsel von warmen und kalten

Klimaphasen zwischen 600 und 300 ka. Im nördlichen Kaukasus korreliert der Zeitraum mit dem Elsterglazial (OIS 12-13) und dem Übergang von warm-trockenem zu kalt-feucht und kalt-trockenem Klima (Doronichev 2008).

### III) Westanatolische Berggottern (*Montivipera xanthina*)

Die tiefen mt-Linien der westanatolischen Berggottern (*Montivipera xanthina*) sind wesentlich älter als ihre Pendants aus Ostanatolien. Die phyletischen Linien der westanatolischen Berggottern lassen sich tektonischen Großformen zuordnen. Abbildung 31 zeigt, wie sich die Vorfahren heutiger Haplotypen gen Westen ausbreiteten. Die Kolonisierung wurde wahrscheinlich früh durch bestehende topographische Strukturen gelenkt und gefiltert. Dabei entfalteten Oberflächenformen Barrierewirkung und isolierten die Populationen voneinander. Populationen aus dem Westtaurus stammen aus der ersten Besiedlungsphase und repräsentieren die älteste Haplotypen-Linie. Ihr Verbreitungsgebiet beschränkt sich vermutlich auf den Zentraltaurus, der im Osten durch die tiefe Talsohle des Göksu-Nehri eine Verbreitungsbarriere zu *M. bulgardaghica* bildet. Im Westen formt eine paläotektonische Struktur, der „Isparta-Angle“, eine zoogeographische Trennlinie. Die tektonische Evolution des „Isparta-Angles“ setzte im späten Miozän-Pliozän ein und ist ein Resultat der Westwärtsdrift des anatolischen Plateaus (Şapaş & Boztepe-Güney 2009). Tektonische Kräfte deformieren die anatolische Platte und führen im Westen zum Auseinanderweichen der Ägäischen Provinz im Uhrzeigersinn, während das anatolische Plateau im „Isparta-Angle“ gestaucht und gegenurzeigerlich gedreht wird und so einen tektonischen Graben bildet (z.B. Glover & Robertson 1998, Koçyiğit & Özacar 2003, Şapaş & Boztepe-Güney 2009, van Hinsbergen et al. 2010). Populationen westlich der tektonischen Formation gehen ebenfalls auf eine separate Besiedlungswelle vor 4,3 Mio. Jahren zurück. Ihre Haplotypen beschränken sich auf Lykien mit den drei tektonischen Formationen Lycian-Nappes, Bey Dağları und Antalya-Nappes. Die tektonische Entwicklung dieser Regionen steht in Verbindung mit der Evolution des „Isparta-Angles“ und der Anhebung des nord-westlich gelegenen Menderes-Massivs (van Hinsbergen et al. 2010). Das Menderes-Massiv ist ein bedeutender metamorpher Komplex in Westanatolien (Okay 2008). Aus diesem Gebiet standen keine Proben zur Verfügung. Möglicherweise beherbergt es aber einen weiteren, bisher nicht identifizierten *xanthina*-Haplotyp. Abbildung 31 zeigt, dass die ägäische Küste bei der Areal-Expansion gen Westen zuletzt kolonisiert wurde. Thrakien wurde in zwei unabhängigen Migrationsrouten während des Pleistozäns besiedelt. Landverbindungen zwischen Kleinasien und Europa waren während des Pleistozäns nur innerhalb eustatischer Meeresspiegelschwankungen vorhanden. In den letzten 500 ka ereigneten sich 5-6 wesentliche glazialeustatische Meeresschwankungen durch Bindung

des Wassers als Festlandeis (Rohling et al. 1998, Rabineau et al. 2006). Währenddessen sank der globale Meeresspiegel um mehr als 120 m, sodass sich der Küstenverlauf im östlichen Mittelmeer veränderte (z.B. Geraga et al. 2000, Perissoratis & Conispoliatis 2003). In der nördlichen Ägäis waren alle großen Inseln mit dem Festland verbunden und Kleinasien war über einen Festlandkorridor an Europa angeschlossen (Perissoratis & Conispoliatis 2003). Die Populationen aus Ephesus (türkische Ägäisküste) und Tekir Dağ (europäisches Thrakien) trennten sich vor 140 ka während der Saale-Kaltzeit, zu einem Zeitpunkt maximaler Inlandvergletscherung, als sich der Meeresspiegel 140 m unter dem heutigen Niveau befand (Rabineau et al. 2006).

Obgleich die Populationen von *M. xanthina* während der pleistozänen Kaltzeiten bis in das europäische Thrakien vordrangen und vermutlich diverse Ägäis-Inseln kolonisierten, verläuft die historische Populationsdemographie seit dem Pleistozän mit einem negativen Trend.

Die rückläufige Populationsdemographie wird auch durch die multimodale Mismatch-Verteilung bestätigt, die auf stark strukturierte oder abnehmende Populationen hindeutet. Test-Statistiken von  $F_s$ ,  $R_2$  und  $R_i$  zeigen jedoch keine signifikanten Abweichungen von konstanten Populationsgrößen an. Die Ergebnisse bestätigen eine starke phylogeographische Strukturierung der westanatolischen Bergotter-Populationen, für die es räumliche, genetische und ökologische Evidenzen gibt.

#### IV) *Montivipera raddei*-Komplex

Die armenischen Bergottern (*Montivipera raddei*-Komplex) haben sich bereits vor 9,5 Mio. Jahren (BEAST-Berechnung, Kapitel 5) bzw. 10,7 Mio. Jahren (PhyloBayes-Berechnung, Kapitel 4) von ihrer Schwestergruppe abgetrennt. Dennoch verfügen die rezenten Populationen über eine äußerst geringe Divergenz, die auf eine erdgeschichtlich junge Radiation schließen lässt (Stümpel & Joger 2009). Das Entstehungszentrum für den getesteten Datensatz liegt in NW-Iran. Nach der Abspaltung von *M. latifii* vor 2,1 Mio. Jahren erfolgte die Kolonisierung ausschließlich in NW-Richtung. Bereits Nilson & Andrén (1986a) führten die Differenzierung innerhalb des *raddei*-Komplexes auf pleistozäne Klimaschwankungen zurück. Die Autoren vermuteten, dass die Populationen in weiter südlich gelegenen Refugialräumen (Kurdistan, Elbrus-Berge) pleistozäne Kaltzeiten überdauerten. Dabei hoben die Autoren die klimatische Stabilität der Elbrus-Berge hervor, die seit dem späten Miozän eine nahezu unveränderte Flora aufweisen (Sitar 1964, zitiert in Nilson & Andrén 1986a) und vermuteten hier das Entstehungszentrum des *raddei*-Komplexes. Nilson & Andrén (1986a), sahen darüber hinaus biogeographische Parallelen in der Verbreitung mit anderen Herpeten und deuteten dies als Anzeichen eines gemeinsamen räumlichen und zeitlichen Ursprungs.

Erst kürzlich entdeckte Populationen des *raddei*-Komplexes aus dem Zagros-Gebirge (Rajabizadeh mündlich) machen erhebliche Kenntnislücken über die Verbreitung des *raddei*-Komplexes im Iran deutlich. Für die Schwestergruppe (*xanthina*-Komplex) vermuteten bereits Schätti et al. (1991) ähnliche Wissenslücken, die sich zum Teil bestätigten (Sindaco et al. 2006).

Klimaverhältnisse und Paläovegetation wurden bis dato im Iran zu sporadisch untersucht (Djamali et al. 2008), als dass sich daraus die historische Sukzession im Pleistozän rekonstruieren ließe. Pollenspektren vom Urmia-See zeigen eine generelle Dominanz von Steppenarten sowohl in Glazialen als auch Interglazialen (Djamali et al. 2008). Mehr als in den europäischen Pollenlagerstätten war im Iran die Humidität prägender Faktor des Vegetationsbildes in den letzten 200 ka. Das Auftreten von Pollen der Kaukasischen Zelkove (*Zelkova carpinifolia*) in den Bohrkernen des Urmia-Sees während des Eem-Interglazials stellt einen Indikator für milde Winter und höhere Frühlings- und Sommerniederschläge dar (Djamali et al. 2008). Auch wenn die Populationen des *raddei*-Komplexes ausgesprochene Steppenbewohner sind, stellen die Halbwüsten des iranischen Hochlandes Barrieren der Ausbreitung dar. Die Besiedlung isolierter Gebirge und die Durchquerung arider Gebiete des heutigen iranischen Plateaus waren also nur in humiden Zeitabschnitten möglich.

#### V) *Macrovipera*

Die Abspaltung der südiranischen Population von der *lebetina*-Stammart ereignete sich vor 6,6 Mio. Jahren im Messinium. Die Zeitstufe wurde durch klimatische und ökologische Umbrüche geprägt. In Europa etablierte sich ein Klima mit ausgeprägter Saisonalität (Mosbrugger et al. 2005), und die Vegetation passte sich durch die Zuwanderung sommergrüner mesothermer Floren aus höher gelegenen Region (Jimenez-Moreno et al. 2007) an die neuen Bedingungen an. Im späten Miozän-Pliozän entwickelte sich wegen des kühleren und trockeneren Klimas zunehmend ein offenes Vegetationsbild mit *Artemisia*, *Amaranthaceae*-*Chenopodiaceae*, *Poaceae* und *Asteraceae*, die trockenem Klima gegenüber resistenter sind (Jimenez-Moreno et al. 2007 und Zitate). Die südiranischen Populationen wurden wahrscheinlich durch Aridisierung und Entstehung von Wüstengebieten von benachbarten Populationen im Zagrosgebirge isoliert.

Der Ursprung rezenter Levanteotter-Haplotypen lässt sich geographisch auf das Dreieck Van, Urmia, Jerewan lokalisieren. Die Radiation der Levanteottern (*Montivipera lebetina*) hat mit Ausnahme des Zypernsubzweiges im Piacentium, der zweiten Hälfte des Pleistozäns, stattgefunden. Steppenfloren waren zu diesem Zeitpunkt bereits in Europa etabliert (Jimenez-Moreno et al. 2007) und prägten im Vorderen Orient wahrscheinlich das

Landschaftsbild. Die phylogeographische Analyse der untersuchten Haplotypen deutet an, dass die Kolonisierung vermutlich entlang eines Vegetationsgürtels erfolgte, der sich um den 36. Breitengrad in ost-westlicher Richtung erstreckte.

Divergenzzeitberechnungen bestätigen die Hypothese von Haas (1952, zit. in Nilson & Andrén 1986a), dass die Populationen der Mittelmeerinsel Zypern auf eine frühere Expansionsphase im späten Pliozän oder frühen Pleistozän zurückgehen. Die phylogeographische Rekonstruktion der Migrationsrouten zeigt eine Kolonisierung über den Golf von Iskenderun. Landverbindungen zwischen Zypern und dem asiatischen Festland sind geologisch nicht belegt (z.B. Ozel et al. 2007). Dennoch spricht das rezente Artinventar der Insel für eine Besiedlung über einen terrestrischen Korridor: „The herpetofauna of Cyprus appears to be a depleted and characteristically modified copy of that of the eastern Levantine coastal region. The majority of the taxa are either identical or closely related in both regions according to our present knowledge.” (Schmidtler et al. 2009, S. 15) (vergl. auch Diskussion in Kap. 6).

Zypern ist durch tektonische Prozesse aus dem Meer gehoben worden (Garfunkel 1998). Landkorridore können daher nur durch eustatische Meeresschwankungen während der messinischen Salinitätskrise oder während pleistozäner Kaltzeiten existiert haben.

Die in Abbildung 33 gezeigten Migrationsrouten der Zypern- und Kykladenstammpopulationen zeigen eine fortschreitende Ausbreitung und Kolonisierung des westlichen Kleinasien. Das heute stark fragmentierte und disjunkte Areal (z.B. Franzen et al. 2008) lässt die ehemalige Verbreitung nicht mehr erkennen. Insbesondere von der türkischen Ägäisküste fehlen Nachweise, die Brückensteine zur Besiedlung der Kykladen gewesen sein könnten. So favorisiert das Programm PhyloMapper eine Kolonisierung der Insel Milos über zwei Migrationsrouten, ausgehend von zwei unterschiedlichen Festlandpopulationen.

Die Stammart der östlichen *taxa obtusa*, *turanica*, *cernovi* und *euphratica* breitete sich zunächst gen Osten aus, kehrte aber in mehreren Immigrationswellen in die westlichen Areale zurück. Nach Isolation und Evolution neuer Haplotypen erfolgte die Rekolonisierung ausgehend von regionalen Exklaven an dem Kaspischen Meer und in Zentralasien. Mangels paläontologischer Pollenfunde aus Zentralasien und dem Orient lassen sich die Ausbreitungsereignisse nicht mit historisch-klimatischen oder botanischen Szenarien vergleichen.

## 9 Historische Biogeographie der Viperinae

### 9.1 Einleitung

Die historische Biogeographie versucht, die Geographie der Speziation, die Verbreitung und die Extinktion von evolutionären Linien und Kladen im Laufe der Erdgeschichte zu rekonstruieren. Studien zur Biogeographie sind eine Synthese aus Ökologie, Evolutionsbiologie, Systematik, Phylogenie, Populationsbiologie, Physiologie, Geologie, Klimatologie und Paläontologie. Die Wiederentdeckung der historischen Biogeographie verdankt ihre Popularität der Molekulargenetik, insbesondere der Entdeckung der molekularen Uhr durch Zuckerkandl & Pauling (1962).

In der Biogeographie werden ökologische und historische Konzepte unterschieden (Wiens & Donoghue 2004, Kodandaramaiah 2009). Die ökologische Biogeographie versucht, Verbreitungsareale mit biotischen und abiotischen Faktoren zu erklären, während die historische Biogeographie phylogenetische Beziehungen zur Erklärung von Verbreitungsmustern nutzt (Sanmartín et al. 2001, Cox & Moore 2005, Lomolino et al. 2006).

Verbreitungsmuster von Organismen werden durch drei wesentliche Prozesse erklärt: Arealausbreitung, Extinktion und allopatrische Speziation (Futuyma 1998).

Allopatrische Speziation kann durch Vikarianz oder Ausbreitung hervorgerufen werden. Historisch bedingt konkurrieren beide Hypothesen miteinander (Zink et al. 2000, Brooks et al. 2001, Kodandaramaiah & Wahlberg 2007). In der aktuellen Debatte wird jedoch beiden Hypothesen gleiche Bedeutung beigemessen (de Queiroz 2005). Das Ziel moderner historischer Biogeographie ist es, Prozesse wie Vikarianz, Ausbreitung und Extinktion in der Geschichte von Organismen aufzudecken (Crisci 2001, Wiens & Donoghue 2004). Dazu sind verschiedene analytische Methoden entwickelt worden, die entweder Parsimonie-Prinzipien nutzen (Ree & Smith 2008, Sanmartín et al. 2008) oder Ereignis-basiert sind (Ronquist 1997).

Im Sinne des „Phylogenetic-niche-conservatism“ sind Arten tendenziell bestrebt, ökologische Präferenzen im Laufe der Evolution beizubehalten (Ricklefs & Latham 1992). Dennoch führen veränderte Umweltbedingungen zur Gründung neuer evolutionärer Linien, durch allopatrische Speziation (z.B. Wiens 2004). Nach der vorherrschenden Meinung sind geographische Faktoren die entscheidenden Kräfte allopatrischer Speziation (z.B. Futuyma 1998).

Geographische Verbreitungsgrenzen von Arten werden durch extrinsische (ökologische) Faktoren sowie intrinsische (organismische) Faktoren vorgegeben (Wiens 2004). Grenzen von Verbreitungsarealen sind dynamischen Prozessen unterworfen. Klimaschwankungen und geotektonische Plattenverschiebungen des Erdmantels haben in erdgeschichtlichen Zeiträumen Verbreitungsgebiete von Organismen verändert.

Die zirkum-mediterrane Region gehört zu den lithologisch, paläogeographisch dynamischsten Regionen der Erde und hat eine sehr komplexe geologische Geschichte. Reorganisationen von Landmassen waren die treibenden Kräfte allopatrischer Speziationsprozesse, die das Mittelmeer zu einem Hotspot biologischer Vielfalt und einem hohen Anteil regionaler Endemismen machen (Palombo 2007).

Die Region ist stark beeinflusst von der Auffaltung des alpidischen Faltungsgürtels, die zu tektonischer Kompression und Fusion zahlreicher Mikroplatten zwischen Afrika und Europa führte. Infolge der tektonischen Vorgänge bewegte sich die eurasische Platte nordwärts und erfuhr zahlreiche Auffaltungen. In Zusammenhang mit drastischen hydrologischen und klimatischen Veränderungen im Känozoikum war die zirkum-mediterrane Region ein sich ständig wandelnder Raum, in dem sich Landmassen und Ökosysteme fortwährend veränderten. Neu entstehende oder verschwindende Seewege zwischen Protomediterran, Paratethys, Nordsee, Indopazifik und Atlantik isolierten oder verknüpften Lebensräume. Im Känozoikum kam es durch Abkühlung des Weltklimas zu globalen Wasserhaushaltsänderungen durch Vergletscherung, in deren Folge der Rückzug des Meeres terrestrische Landbrücken frei gab, die als Migrationsrouten interkontinentalen Faunenaustausch ermöglichten (z.B. Voris 2000). Immigranten anderer Kontinente drangen in die unabhängig voneinander evolvierten Ökosysteme und Tiergemeinschaften ein. Die neuen Bewohner nahmen Einfluss auf die etablierten Strukturen und beschleunigten Speziation, Aussterbeprozesse oder erhöhten im einfachsten Fall die Artenvielfalt (Vermeij 1991).

Die tektonische Evolution der zirkum-mediterranen Landmassen hatte einen drastischen Einfluss auf die Artbildung der mediterranen Herpetofauna. Arealveränderungen bei Viperiden sind allerdings nur durch wenige Fossilfunde aus Europa dokumentiert (Szyndlar & Rage 1999).

Fossilisierung ist naturgemäß ein seltenes Ereignis. Fossilfunde sind daher immer mit einem zeitlichen und räumlichen „Bias“ behaftet und bieten in den seltensten Fällen eine vollständige Überlieferung der Ahnenreihe. Für ein Drittel aller Tierphyla existiert kein Fossilnachweis, obwohl die Linien schon seit mindestens 500 Mio. Jahren existieren (Valentine et al. 1999). Der Fossilrekord unterschätzt die tatsächliche Divergenz zweier Linien immer erheblich (Hedges & Kumar 2004). Die Abfolge des Auftretens einer Linie im

Fossilrekord ist jedoch kein zufälliges Produkt. Jedes Fossil steht für eine evolutive Linie, die der zeitlichen Dimension eines Baumes ein absolutes Signal verleiht (Benton & Donoghue 2007). Paläontologische Daten sind allerdings nur als Minimumgrenzen für die Kalibrierung zu verwenden (z.B. Benton & Ayala 2003). Traditionell gibt es für Kalibrierungen nur wenige Eichpunkte, die einer kritischen Prüfung standhalten.

Artefakte und fehlerhafte Fossilbestimmungen erschweren häufig zuverlässige Datierungen von Chronogrammen. Gandolfo et al. (2008) nennen fünf Gründe für Unsicherheiten der Fossilkalibrierung: 1) Fossilerhaltung, 2) taxonomische Identifizierung, 3) Identifizierung fossiler Homologien, 4) Probenumfang, 5) Bestimmung des Fossilalters.

Schlangenfossilien sind meist unvollständig erhalten. Von ihren Überresten werden am häufigsten die robusten Wirbelkörper gefunden (Szyndlar & Rage 1999). Verformung oder partielle Zerstörung der Fossilien erschweren allerdings die taxonomische Zuordnung. In Verbindung mit unzureichender Identifizierung homologer Strukturen kann das zur falschen Identifizierung führen. Weitere mögliche Fehlerquellen ergeben sich aus Diskrepanzen bei der Altersdatierung durch stratigraphische Unsicherheiten und sich verändernde Definitionen von geologischen Epochen (Agustí et al. 2001, Gandolfo et al. 2008).

In einem Review über die ältesten fossilen Vipern Europas illustrieren und beschreiben Szyndlar & Rage (1999) alle relevanten Fundstücke. Nur wenige der fossilen Wirbelkörper können als Anhaltspunkte zur Rekonstruktion der Paläobiogeographie genutzt werden. Die Autoren betonen, dass die ältesten fossilen Wirbel denen rezenter Taxa sehr ähnlich sehen. Dennoch ist die Identifizierung der Wirbelkörper nicht bis auf das Artniveau möglich und es sind nicht alle Gattungen gleichmäßig häufig unter den Fundstücken vertreten. Das Gros der Fundstücke wurde den Ahnen der rezenten Gattung *Vipera* zugerechnet. Szyndlar & Rage (1999) resümieren: „*Fossil Viperidae do not contribute useful information when dealing with the phylogeny of the group. However, they provide the latest possible dates for the appearance of various viperid lineages.*“

Der Fossilrekord eurasischer Viperinae bietet keine zuverlässigen Kalibrierungspunkte für Phylogenien. Taxonomische Unsicherheiten bei der Identifizierung lassen zu viel Spielraum bei der Zuordnung der Fossile zu einer bestimmten phylogenetischen Linie.

Ursenbacher et al. (2008) verwendeten zur Kalibrierung ihrer Phylogenie das älteste bekannte Vipernfossil aus Europa. *Vipera antiqua* (Szyndlar & Böhme 1993) ist aus Deutschland und Frankreich in mehreren Fundstücken belegt. Das fossile Taxon wurde der Biozone MN 1 und MN 2 zugeordnet. Szyndlar & Rage (1999) heben die Ähnlichkeit von *V. antiqua* zu der rezenten *V. ammodytes* hervor. Die fossile Viper wurde zweifelsfrei als



Vertreter der Gattung *Vipera* identifiziert, dennoch lässt sich das Fossil in der Phylogenie nicht eindeutig platzieren. Durch die Ähnlichkeit zu *V. ammodytes* könnte das Fossil sowohl ein direkter Ahne von *V. ammodytes* oder auch ein Stammlinienvertreter der Gattung *Vipera* (s.l.) gewesen sein. Fehleinschätzungen der Divergenzzeiten innerhalb der Viperinae sind damit sehr wahrscheinlich.

Wüster et al. (2008) benutzten zur Datierung ihres Chronogrammes multiple Kalibrierungspunkte. Die Autoren verwendeten zur lokalen Kalibrierung des Viperinae-Subzweiges ebenfalls fossile Eichpunkte von Szyndlar & Rage (1999). Wüster et al. nehmen an, die initiale Radiation eurasischer Viperinae habe vor 20 Mio. Jahren begonnen. Tatsächlich ist die Annahme aber nicht ausreichend gut durch Fossilfunde gestützt. Zu Beginn der Biozone MN 3 sind lediglich Taxa der Gattung *Vipera* gut belegt. Dazu zählen fossile Vertreter der Gattung *Vipera* aus Stubersheim (Szyndlar & Rage 1999) und Zentralasien (Chkhikvadze 1985). Der einzelne fossile Wirbelfund einer orientalischen Viper aus Lissabon (Antunes & Rage 1974) scheint fragwürdig. Szyndlar & Rage (1999) ziehen das Auftreten orientalischer Vipern im unteren Miozän in Betracht, schwächen die Aussage aber durch die Formulierung im Konjunktiv ab: „First ‚Oriental Vipern‘ may have appeared in Europe in the lower Miocene (MN 3), as indicated by a single large vertebra found in Lisboa (Antunes & Rage 1974: Fig. 4).“ (S. 14). Der Fossilrekord zeigt, dass eine Radiation eurasischer Viperinae in die Linien *Vipera*, *Macro-*, *Montivipera* und *Daboia* erst sicher aus der Biozone MN 4 zu belegen ist.

Der Systematik eurasischer Viperiden wird seit je her, nicht zuletzt auch wegen der medizinischen Bedeutung, hohe Aufmerksamkeit zuteil (Schwarz 1936, Saint Girons 1980, Bruno 1984). Molekulare Methoden ermöglichen es, die Phylogenie der Viperidae zu entschlüsseln (z.B. Lenk et al. 2001) und ihre Biogeographie zu rekonstruieren (z.B. Wüster et al. 2008).

Wüster et al. (2008) versuchten mithilfe der „Dispersal-Vicariance“-Analyse, den Ursprung der Viperidae aufzudecken. Als besonders wahrscheinlich sehen die Autoren einen monokontinentalen Ursprung der Viperidae in Asien und der Viperinae in Afrika an.

Trotz der hohen morphologischen Diversität und der zirkum-mediterranen Verbreitung der eurasischen Viperinae fehlen plausible Erklärungen zu ihrer biogeographischen Entstehung. Einmalige erdgeschichtliche Ereignisse, mit vikariierender Wirkung auf die Verbreitung der Biota sind prädestiniert, Divergenzzeiten zwischen allopatrisch oder parapatrisch verbreiteten Geschwister-Taxa in einem rigorosen Test zu validieren. Der heutige Mittelmeerraum hat seit dem Känozoikum durch plattentektonische Verschiebungen fundamentale Reorganisationen der Landmassen erfahren (z.B. Popov et al. 2004). Die

See-Landmassenverteilung im Gebiet der Tethys und Paratethys gilt durch zahlreiche geophysische und paläobiogeographische Untersuchungen vom Oligozän bis Miozän als gut untersucht. Mehrfach wurde der integrative Versuch unternommen, multidisziplinäre Untersuchungen für die Rekonstruktion der Paläooberflächen zu nutzen (z.B. Rögl 1999, Dercourt et al. 2000). Besonders detailreich wird der Wechsel und die Dynamik der terrestrischen Landmassen für ausgewählte Zeitfenster von Popov et al. (2004) abgebildet.

Nur absolute Divergenzzeiten zwischen Linien erlauben es, eindeutige Rückschlüsse zwischen klimatischen und geologischen Effekten auf die Speziation und Ausbreitung von Organismen zu ziehen. Divergenzzeiten sind essentiell für den kritischen Test und die Validierung von Speziationsprozessen in einem historisch biogeographischen Kontext (Sanmartín et al. 2001).

Errechnete Divergenzzeiten sind als reine Knoten-Divergenzzeiten kein Beweis für ihre Richtigkeit. Divergenzzeiten sind nur dann überzeugend, wenn sie in Konkordanz mit unabhängigen geologischen oder paläontologischen Daten sind. Mit Hilfe von phylogenetischen Schwesterarten oder sogenannten „geminate species“ (Jordan 1908) lassen sich, in Verbindung mit paläogeographischen Rekonstruktionen, Hypothesen zu molekulargenetischen Divergenzzeiten testen und validieren.

Im Folgenden soll versucht werden, die paläogeographischen Verbreitungen der Vipern auf der Basis molekularer Divergenzzeiten zu skizzieren. Dazu wurden die Divergenzzeiten wesentlicher phylogenetischer Gruppen auf paläogeographische „High-resolution“-Zeitfenster von Popov et al. (2004) und Rögl (1999) übertragen und mit Fossilfunden aus Szyndlar & Rage (1999) korreliert.

Die Rekonstruktion hypothetischer ancestraler Areale basiert auf drei simplen biogeographischen Annahmen: 1) Vikarianz und Ausbreitung sind wesentliche Faktoren der Speziation. 2) Es gibt keine Extinktion im Zentrum der Radiation und 3) Arten sind bestrebt, im Laufe der Evolution ihre ökologische Präferenz beizubehalten („phylogenetic niche conservatism“, Ricklefs & Latham 1992, Wiens 2004).

Ziel der nachfolgenden Untersuchungen ist es, Prozesse wie Vikarianz, Ausbreitung und Extinktion der eurasischen Viperinae aufzudecken und molekulare Divergenzzeiten mithilfe historischer Verbreitungsszenarien zu validieren.

## 9.2 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieses Kapitels besteht aus der „Dispersal-Vicariance“-Analyse und einer paläobiogeographischen Hypothese zur Evolution eurasischer Viperinae. Während die „Dispersal-Vicariance“-Analyse ein Ergebnis selbstständig erhobener Daten ist, wurden für

die biogeographische Rekonstruktion bereits publizierte Erkenntnisse von Popov et al. (2004) und Rögl (1999) herangezogen und auf Koinzidenz zu Divergenzzeiten aus Kapitel 4 geprüft. Damit stellt die paläobiogeographische Rekonstruktion kein direktes Ergebnis sondern eine interdisziplinäre Hypothese dar.

Die „Dispersal-Vicariance“-Analyse (Abbildung 37) zeigt für tief liegende Knoten der Phylogenie keine Priorität für ein bestimmtes Ursprungsgebiet. Stammlinienvertreter afrikanischer und eurasischer Viperinae haben mehrere alternative ancestrale Verbreitungsgebiete, genauso wie die Stammlinienvertreter eurasischer und orientalischer Viperinae. Ahnen der Gattung *Vipera* waren in Europa verbreitet (100%,  $p=0,9$ ). Die ancestralen Verbreitungsgebiete der Gattung *Montivipera* waren mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Kleinasien beschränkt (91%,  $p=0,75$ ), alternativ auf Kleinasien und den Nahen und Mittleren Osten (9%). Levanteottern der Gattung *Macrovipera* hatten ihre ancestralen Verbreitungsgebiete zu 91% im Nahen und Mittleren Osten. Der gemeinsame Stammlinienvertreter von *Monti-* und *Macrovipera* hatte drei alternative Verbreitungsgebiete, wobei ein biterritorialer Ursprung in Kleinasien und dem Nahen und Mittleren Osten am wahrscheinlichsten ist (73%). Die „Dispersal-Vicariance“-Analyse schlägt für die Gattung *Daboia* einen afrikanisch-indischen Ursprung (100%,  $p=0,88$ ) ohne Alternativen vor.

Für die Rekonstruktion der Paläobiogeographie eurasischer Viperinae wurden berechnete Divergenzzeiten der Abbildung 23 und Abbildung 15 auf paläogeographische Karten von Rögl (1999) und Popov et al. (2004) übertragen. Die Abbildungen 38 bis 51 skizzieren die Verteilung von Meer und Festland in einer Serie von 14 Zeitschnitten zwischen dem späten Eozän (37-34 Mio. Jahre) und dem mittleren Miozän (8,5-7 Mio. Jahre). Die paläogeographische Rekonstruktion des Mediterran und der Paratethys ermöglicht, in Verbindung mit molekularen Divergenzzeiten, historische Migrationsrouten zu dokumentieren. Die Zusammenführung von molekularen Divergenzzeiten und paläogeographischen Ereignissen besitzt hohe Koinzidenz und weist die Vikarianz als treibende Kraft der Speziationsprozesse bei eurasischen Viperinae aus.

Der Split zwischen afrikanischen und eurasischen Viperinae datiert sich auf 38,5 Mio. Jahre (Kapitel 4, Abbildung 15), einen Zeitpunkt, der von den paläogeographischen Karten von Rögl (1999) und Popov et al. (2004) nicht erfasst wird. Abbildung 38 zeigt die Situation im späten Eozän vor 37-34 Mio. Jahren. Molekulare Datierung und Landmassenverteilung sind hier nicht im Widerspruch. Altweltliche Viperinae waren zu diesem Zeitpunkt bereits durch eine marine Seeverbindung zwischen Indischem Ozean und Paratethys (Mesopotamisches

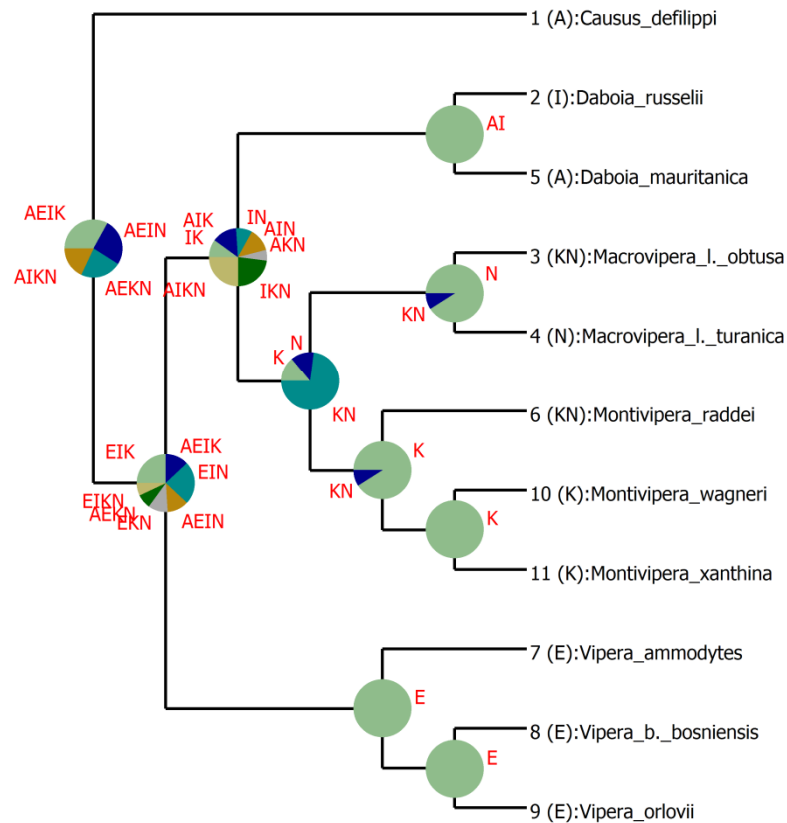


Abbildung 37: „Dispersal-Vicariance“-Analyse eurasischer Viperinae (Datensatz 3542). Die Knoten-Diagramme zeigen die relative Wahrscheinlichkeit alternativer Verbreitungsareale von 1000 bayesianischen Bäumen. Die bayesianische Analyse basiert auf den Aminosäuresequenzen von 11 verketteten proteincodierenden Genen des mitochondrialen L-Stranges (ohne ATP8) mit insgesamt 3455 Alignmentpositionen (das entspricht 10.365 Nukleotiden). Hypervariable Sequenzpositionen wurden zuvor mit dem Programm trimAl (Capella-Gutiérrez et al. 2009) analysiert und von nachfolgenden Berechnungen ausgeschlossen. Der 50%-majority-rule-Konsensusbaum wurde unter Verwendung des CAT-poisson-models mit dem Programm PhyloBayes 3.2d (Lartillot et al. 2007) berechnet. Die verwendeten biogeographischen Areale sind: A=Afrika, E=Europa, I=Indien, K=Kleinasien, N=Naher und Mittlerer Osten einschließlich Mittelasien.

Becken) in eine afrikanische und eurasische Stammgruppe differenziert. Landmassen des heutigen Skandinaviens, Russlands und Europas waren zu dieser Zeit von Vipern nicht besiedelt. Die Turgaj-Straße („*Turgaj Strait*“) war vom mittleren Jura bis zum Oligozän eine persistent vorherrschende Seeverbindung zum Polarmeer, die Europa von Asien trennte

und eine tiergeographische Grenze bildete. Europa war zu diesem Zeitpunkt immer noch ein Archipel.

Das frühe Oligozän (Rupelium, 34-32 Mio. Jahre) war mit entscheidenden tektonischen und klimatischen Veränderungen verbunden, die die Grundlage für nachfolgende allopatrische Artbildung bildeten (Abbildung 39).

Eine weltweite klimatische Abkühlung führte zu eustatischem Absinken des Meeresspiegels. Infolgedessen fiel die Turgaj-Straße trocken und öffnete asiatischen und amerikanischen Faunenelementen die Passage gen Westen. Der fallende Meeresspiegel ließ eine Landverbindung zwischen Asien und dem heutigen Kleinasien entstehen (Elburz-Kopetdagh-Landbrücke), die Stammarten der orientalischen Vipern (s.l.) die Migration nach Kleinasien ermöglichte. Die weltweite klimatische Abkühlung veränderte Lebensraumbedingungen und zwang Viperiden, sich den neuen äußeren Bedingungen anzupassen. Stammarten der rezenten Gattung *Vipera* passten sich dem Jahreszeitenklima Nord- und Mitteleuropas durch Ausbildung einer Kältetoleranz an und spalteten sich von den mediterran subtropisch verbreiteten orientalischen Vipern zwischen oberem und unterem Rupelium, im frühen Oligozän vor 29,8 Mio. Jahren, ab. Das Zeitfenster wird durch die paläogeographische Rekonstruktionen der Abbildungen 40 und 41 erfasst. Im unteren Rupelium (32-30 Mio. Jahre, Abbildung 40) wurde die Paratethys vom Mediterran isoliert. Stammarten orientalischer Vipern (s. l.) besiedelten ein kontinuierliches Landmassiv von Indien bis auf die anatolisch, dinarische Halbinsel. Das Proto-Mediterran hatte noch offene Seeverbindungen zum Atlantik und Indopazifik. Mit dem Verlanden der Turgaj-Meerenge verbreiteten sich die Stammarten der rezenten Gattung *Vipera* westwärts bis an den Oberrheingraben, der eine See Verbindung zum nördlichen Atlantik herstellte.

Im nächsten Zeitfenster (Abbildung 41) des späten Oligozäns (Chattium, zwischen 29-24 Mio. Jahren) wurde das anatolisch-taurische Land erneut vom asiatischen Festland getrennt. Die geographische Trennung orientalischer Vipern in zwei biogeographisch getrennte Linien ist die Geburtsstunde der Stammlinienvertreter von *Macro-*, *Montivipera* und *Daboia*. Von diesem Zeitpunkt an evolvieren orientalische Vipern in Kleinasien unabhängig von den festländischen Populationen in geographischer Isolation.

Die Öffnung des Seeweges vom Indischen Ozean zur Paratethys und der damit verbundenen Trennung orientalischer Vipern in die beiden Schwesterlinien ist in Konkordanz mit der molekulargenetischen Divergenzzeitberechnung. Der Split zwischen *Macro-*, *Montivipera* und *Daboia* datiert sich auf 26,7 Mio. Jahre.

Im Vergleich zum oberen Oligozän blieb die wesentliche Konfiguration der Paratethys im frühen Miozän (Aquitanium, 23,8 bis 20,5 Mio. Jahre, MN 1-2) unverändert (Abbildung 42).

Im westlichen Mittelmeer entstand durch Gegenurzeiger-Rotation des Apenninen-Beckens eine lange Inselkette. Durch das Trockenfallen des Rheingrabens entstand eine geschlossene Landverbindung, die Faunenaustausch zwischen West- und Mitteleuropa ermöglichte. Stammarten von *Vipera* konnten nun bis zum Atlantik vordringen. Offene Seeverbindungen persistierten zwischen Paratethys, Mediterran und Indopazifik bis ins Aquitanium und frühe Burdigalium. Die Zirkulation des Mediterrans über Indopazifik und Atlantik blieb offen. Das anatolisch-taurische Land blieb eine Insel zwischen Mediterran und Paratethys.

Abbildung 43 zeigt ein Zeitfenster im frühen Miozän zwischen 20,5 und 19 Mio. Jahren. Nach einer kurzzeitigen Transgression prädominieren regressive Tendenzen in der östlichen Paratethys. Große Teile des heutigen Irans waren von Schelfmeeren bedeckt, die in Verbindung zum Indopazifik standen. Das Zagrosgebirge wurde emporgehoben, infolgedessen es zur Ablagerung von Evaporiten im Mesopotamischen Becken kam. Das anatolisch-taurisch-pontische Land und große Teile des heutigen Balkans, einschließlich der Alpen, waren durch schmale Meeresstraßen vom Festland getrennt. Zu diesem Zeitpunkt konnten Stammarten von *Vipera* den Balkan nicht besiedeln. Ahnen der *Macro-*, *Montivipera*-Gruppe evolvierten bis zum frühen Eggenburgium (MN 3) 9 Mio. Jahre lang in vollkommener Isolation.

Im frühen Burdigalium (18,8 bis 17,3 Mio, MN 3-4) führten tektonische Ereignisse zur Reorganisation der Landmassen im östlichen Mediterran und der Paratethys. Die gegenurzeigerliche Rotation Afrikas und Arabiens führte zur Kollision mit der anatolischen Platte. In Verbindung mit einer Meeresregression wurde der Seeweg zwischen Mittelmeer und Indischem Ozean erstmals geschlossen. Die neu entstandene *Gomphotherium*-Landbrücke stellte eine Verbindung zwischen Afrika und Eurasien her (Abbildung 44), die interkontinentalen Faunenaustausch ermöglichte. In dem subtropischen Klima migrierten Stammlinienvertreter von *Daboia* in der Säugerzone MN 4 von Indien nach Nordafrika und Ahnen der *Monti*- und *Macrovipera*-Gruppe eroberten Mittelasien und vermutlich Europa. Die *Gomphotherium*-Landbrücke war nicht persistent. Im Ottnangium kommunizierte die zentrale Paratethys phasenweise wieder über die alpine „Foredeep“ mit dem westlichen Mittelmeer. Eine breite Landverbindung zwischen Kleinasien und dem Balkan eröffnete einen Migrationskorridor gen Westen.

Der Zeitschnitt der Abbildung 45 zeigt das obere Burdigalium zwischen 17,3 bis 16,4 Mio. Jahren. Landmassen blieben im Wesentlichen unverändert. Stammarten von *Macro-*, *Montivipera* besiedelten ein geschlossenes Areal vom westlichen Mittelmeer bis nach Mittelasien. Stammarten von *Vipera* eroberten in dieser Periode den Balkan. In die Abteilung fällt auch der Split zwischen *Vipera ammodytes* und *V. berus bosniensis* (17,1

Mio. Jahre). Der Split der beiden Linien im oberen Burdigalium ist nicht direkt durch tektonische Ereignisse gestützt. Dafür kommt eher das frühe Burdigalium (18,8 bis 17,3 Mio.) oder das Chokrakium (16-15 Mio. Jahre) in Betracht.

Im mittleren Miozän (Langhium, Chokrakium) (Abbildung 46) griff das Meer infolge einer zirkum-mediterranen Transgression auf weite Festlandflächen über. Der Anstieg des Meeresspiegels ließ die instabile, vorübergehende Landbrücke zwischen Kleinasien, Kaukasus und Afrika im Chokrakium (MN 5) kollabieren. Das zusammenhängende Verbreitungsareal des *Macro-* und *Montivipera*-Stammlinienvertreters war damit unterbrochen. In dem subtropischen Klimaoptimum evolvierten die Linien *Macrovipera* und *Montivipera* isoliert voneinander auf gleicher Breitenlage und unter ähnlichen klimatischen Bedingungen. Der molekulargenetisch ermittelte Split zwischen *Macrovipera* und *Montivipera* (15,3 Mio. Jahre) koinzidiert mit den tektonischen Ereignissen.

Vor 15-14 Mio. Jahren sank im unteren Serravallium der Meeresspiegel (Abbildung 47). In Verbindung mit einer zirkum-mediterranen Regression fielen marine Bereiche trocken. Seewege zwischen Mittelmeer und Indischem Ozean sowie zum Transkaukasischen Becken wurden geschlossen. Die Paratethys wurde von ozeanischen Verbindungen abgeschlossen. Es kommt zur "Salinity-crisis" der Paratethys.

In dem abgebildeten Intervall (Abbildung 48) vor 14-13 Mio. Jahren (Serravallium) wurde die Paratethys zum letzten Mal vom Indischen Ozean geflutet. Das Mediterran blieb vom Atlantik gespeist. Ablagerungen von Evaporiten zeigen das phasenweise Zurückweichen des Meeres im Bereich der östlichen und südlichen Paratethys. Biogeographische Veränderungen der Großgruppen fanden nicht statt und die wesentlichen Stammlinien der heutigen Gattungen sind bereits evolviert. Möglicherweise wurden Ahnen der *ammodytes*-Linie durch Isolation auf der Balkaninsel vom *aspis-latastei*-Stamm getrennt.

Im oberen Serravallium (13-12,2 Mio. Jahre, Abbildung 49) wurde die offene Verbindung zwischen Paratethys und Indischem Ozean unterbrochen. Entlang der Bitlis-ostanatolischen Faltungszone blieb jedoch eine schmale Seeverbindung zum Mediterran für kurze Zeit erhalten und separierte die Stammart von *Montivipera* in eine westliche und östliche Gruppe. Der berechnete Split zwischen der *xanthina*- und *raddei*-Gruppe ist auf 10,7 Mio. Jahre datiert, einem Zeitpunkt, zu dem kein entsprechendes tektonisches Ereignis vorliegt, das die Trennung der beiden Gruppen erklären könnte. Der letzte gemeinsame Vorfahre dürfte demnach mindestens 1,5 Mio. Jahre älter sein.

Abbildung 50 bildet die Situation vor 12-11 Mio. Jahren im späten Serravallium ab. Sie zeigt die Entstehung des Ägäischen Meeres und der Pannonischen See. Die Paratethys wird weitestgehend vom Mediterran isoliert. *Montivipera xanthina* und *M. raddei* sind bereits etablierte Linien.

Im späten Miozän (8,5-7 Mio. Jahre, Abbildung 51) trennte ein Seeweg zwischen Persischem Golf und dem Golf von Iskenderun die *bornmuelleri*- von der *xanthina*-Artengruppe. *Montivipera xanthina* wurde von *M. wagneri* vor 6,2 Mio. Jahren separiert. Das Divergenzalter steht nicht im Widerspruch zu den tektonischen Ereignissen. Der Knoten zwischen *M. xanthina* und *M. wagneri* ist jünger als der Knoten zwischen *M. xanthina* und *M. bornmuelleri* (z.B. Abbildung 23). Das Divergenzalter zwischen *M. xanthina* und *M. bornmuelleri* lässt sich für den Datensatz 3542 nicht beziffern, dürfte aber um wenige Millionen Jahre älter sein als der Split zwischen *M. xanthina* und *M. wagneri*.



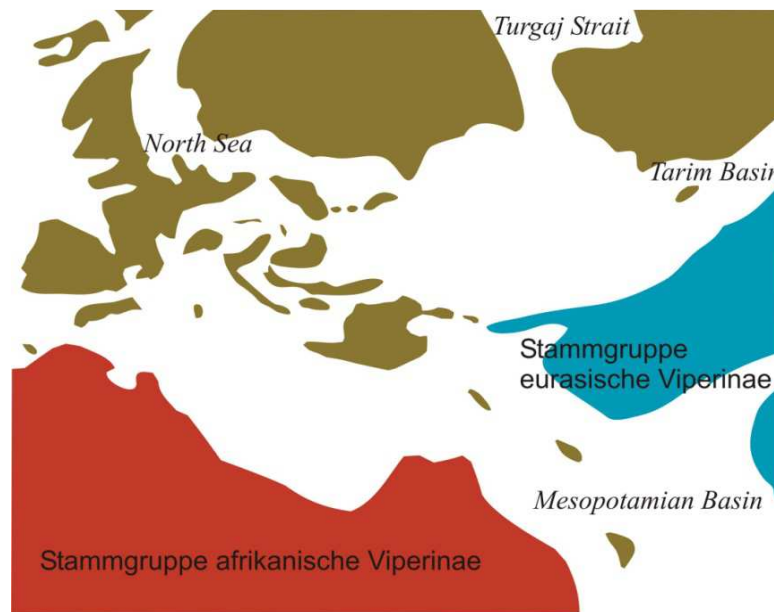


Abbildung 38: Paratethys und Mediterran im späten Eozän vor 37-34 Mio. Jahren (ergänzt nach Popov et al. 2004). Die altweltlichen Viperinae sind zu diesem Zeitpunkt bereits durch das Mesopotamische Becken in eine afrikanische und eine eurasische Stammgruppe differenziert (berechnete Divergenzzeit afrikanische vs. eurasische Viperinae 38,3 Mio. Jahre). Die Turgaj-Straße („Turgaj-Strait“) ist von der mittleren Jura bis zum Oligozän eine persistent vorherrschende Seeverbindung zum Polarmeer, die Europa von Asien trennt und eine tiergeographische Grenze bildet. Europa ist zu diesem Zeitpunkt immer noch ein Archipel.

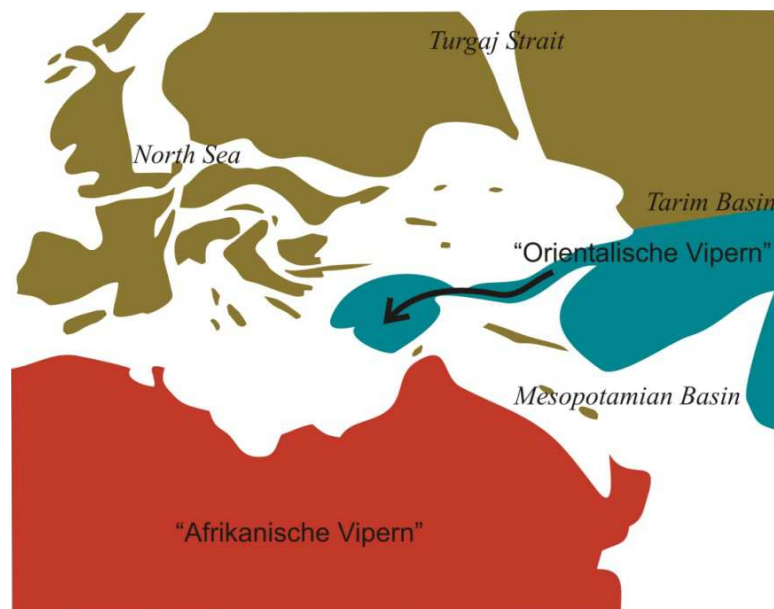


Abbildung 39: Paratethys und Mediterran im frühen Oligozän vor 34-32 Mio. Jahren (ergänzt nach Popov et al. 2004). Die zum Ende des Eozäns einsetzende weltweite klimatische Abkühlung korreliert mit der Aufspaltung eurasischer Vipern in eine kältetolerante Gruppe (Stammarten der rezenten Gattung *Vipera*) und eine mediterran subtropisch verbreitete Gruppe (orientalische Vipern). Berechnete Divergenzzeit *Vipera* vs. orientalische Vipern 29,8 Mio. Jahre. Die Anhebung des Elburz-Kopetdag-Massivs bildet eine Landverbindung zum anatolisch-taurisch-pontischen Land und ermöglicht die Kolonisierung durch orientalische Vipern (schwarzer Pfeil).

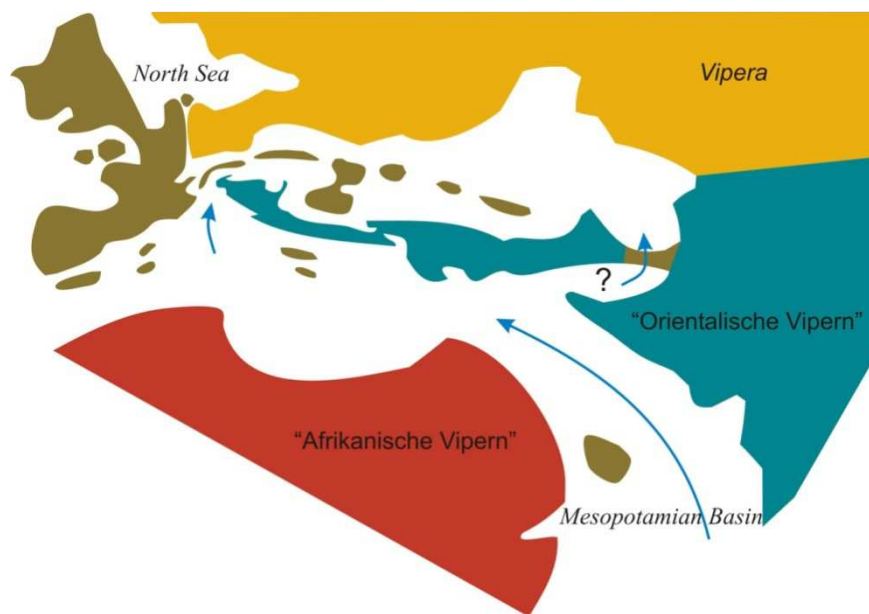


Abbildung 40: Paratethys und Mediterran im frühen Oligozän (Rupelium) vor 32-30 Mio. Jahren (ergänzt nach Rögl 1999). Die Abschnürung der Paratethys erreicht ihren Höhepunkt. Lediglich über den Oberrheingraben besteht noch eine Verbindung zum nördlichen Atlantik. Das Proto-Mediterran hatte noch offene Seeverbindungen zum Atlantik und Indopazifik (blaue Pfeile). Mit dem Verlanden der Turgaj-Meerenge verbreiten sich die Stammarten der rezenten Gattung *Vipera* westwärts. Berechnete Divergenzzeit *Vipera* vs. orientalische Vipern 29,8 Mio. Jahre.



Abbildung 41: Paratethys und Mediterran im späten Oligozän vor 29-24 Mio. Jahren (ergänzt nach Popov et al. 2004). Kleinasien wird erneut vom asiatischen Festland getrennt und bleibt für mindestens 9 Mio. Jahre isoliert. Orientalische Vipern evolvieren in Kleinasien von nun an in geographischer Isolation. Europa bleibt ein Archipel. Berechnete Divergenzzeit *Daboia* vs. Stammgruppe von *Monti-* und *Macrovipera* 26,7 Mio. Jahre.

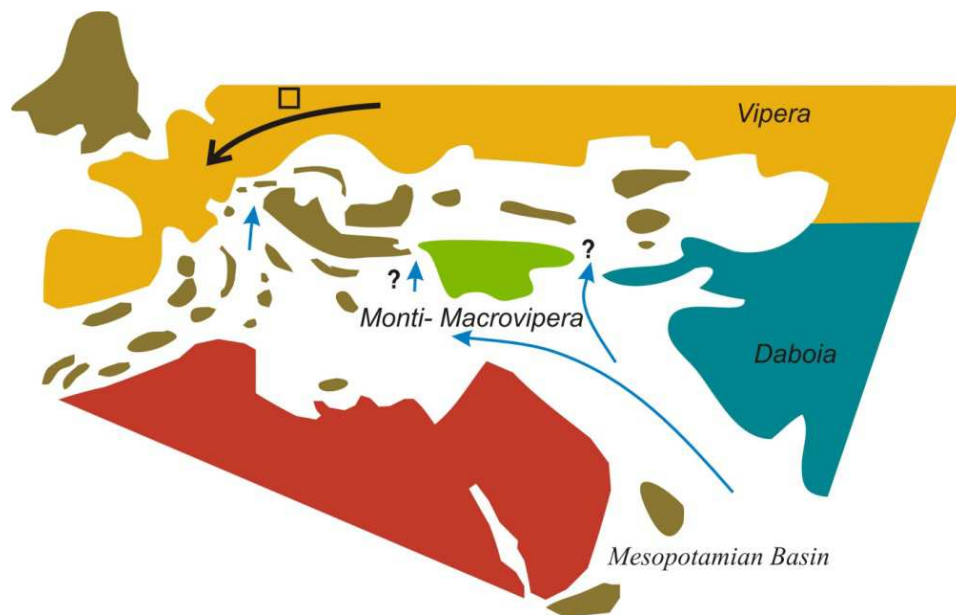


Abbildung 42: Paratethys und Mediterran im späten Oligozän (Aquitanium) vor 23,8-20,5 Mio. Jahren, MN 1-2 (ergänzt nach Popov et al. 2004). Eine geschlossene Landverbindung ermöglicht Faunenaustausch zwischen West- und Mitteleuropa (schwarzer Pfeil). Offene Seeverbindungen persistieren zwischen Paratethys, Mediterran und Indopazifik (blaue Pfeile). Fossilfunde nach Szyndlar & Rage 1999: *Vipera antiqua* aus Weisenau (MN 1) (Quadrat). Nicht abgebildete Fossilfunde des „*V. aspis*-Komplex“ aus Frankreich, St-Gérand-le-Puy (MN 1-2), Laugnac, Bouzigues, Marcoin (alle MN 2).



Abbildung 43: Paratethys und Mediterran im frühen Miozän (Burdigalium) vor 20,5-19 Mio. Jahren, MN 2-3 (ergänzt nach Popov et al. 2004). Eine Meeresregression in der östlichen Paratethys führt zur Ablagerung von Evaporiten im Mesopotamischen Becken. Kleinasien ist bis zu diesem Zeitpunkt seit ca. 9 Mio. Jahren isoliert. Fossilfunde nach Szyndlar & Rage 1999: „*Vipera aspis*-Komplex“ (Quadrate): St-Gérand-le-Puy (MN 1-2), Laugnac, Bouzigues, Marcoin (alle MN 2), Stubersheim (MN 3). Orientalische Vipern (Kreis): Lissabon (MN 3).

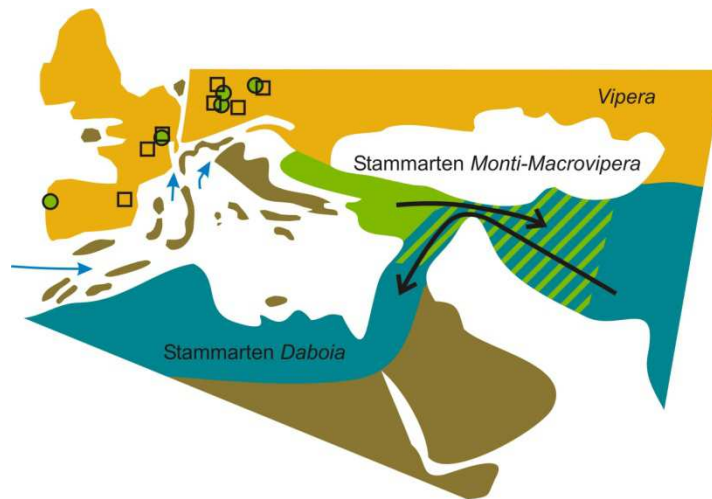


Abbildung 44: Paratethys und Mediterran im frühen Miozän (spätes Burdigalium) vor 18,8-17,3 Mio. Jahren, MN 3,4 (ergänzt nach Rögl 1999). Die Rotation Afrikas und Arabiens und schließlich die Kollision mit Eurasien schließen die offene Seeverbindung mit dem Indopazifik. Erstmals verbindet die *Gomphotherium*-Landbrücke (MN 4) Afrika und Asien und ermöglicht Faunenaustausch (schwarze Pfeile). Stammmarten von *Monti-* und *Macrovipera* mit Ursprung in Kleinasien erobern Mittelasien, während Stammmarten von *Daboia* auf den afrikanischen Kontinent vordringen (berechnete Divergenzzeit *Daboia mauritanica* vs. *D. russelii* 18,9 Mio. Jahre). Im Ottnangium kommuniziert die zentrale Paratethys phasenweise über die alpine „Foredeep“ mit dem westlichen Mittelmeer (blaue Pfeile) und unterbricht zusammenhängende Areale. Eine breite Landverbindung zwischen Kleinasien und dem Balkan eröffnet einen Migrationskorridor gen Westen. Fossilfunde nach Szyndlar & Rage 1999. „*V. aspis*-Komplex“ (Quadrate): Stubersheim (MN 3), Agramon, Artenay, Oberdorf, Petersbuch, Dolnice (alle MN 4), Vieux-Collognes (MN 4-5). Orientalische Vipern (Kreise): Lisboa (MN 3), Artenay, Langenau, Petersbuch, Dolnice (alle MN 4).

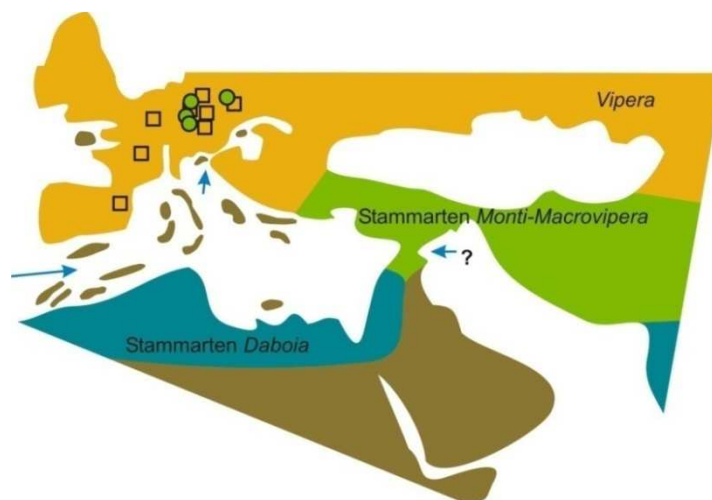


Abbildung 45: Paratethys und Mediterran im frühen Miozän (Burdigalium) vor 17,3-16,4 Mio. Jahren, MN 4-5 (ergänzt nach Rögl 1999). Landmassen bleiben im Wesentlichen unverändert. Möglicherweise verbindet ein Seeweg das Mittelmeer mit dem Persischen Golf (blaue Pfeile) und trennt *Daboia* in afrikanische und eurasische Arten (berechnete Divergenzzeit *Daboia mauritanica* vs. *D. russelii* 18,9 Mio. Jahre). Stammmarten von *Vipera* erobern in dieser Periode möglicherweise den Balkan (berechnete Divergenzzeit *Vipera ammodytes* vs. *Vipera berus bosniensis* 17,1 Mio. Jahre). Fossilfunde nach Szyndlar & Rage 1999. „*V. aspis*-Komplex“ (Quadrate): Agramon, Artenay, Oberdorf, Petersbuch, Dolnice (alle MN 4), Vieux-Collognes (MN 4-5), Randecker Maar (MN 5-6), Oggenhausen (MN 5-6). Orientalische Vipern (Kreise): Artenay, Langenau, Petersbuch, Dolnice (alle MN 4).



Abbildung 46: Paratethys und Mediterran im mittleren Miozän (Langhium) vor 16-15 Mio. Jahren, MN 5 (ergänzt nach Popov et al. 2004). Infolge einer Transgression im mittleren Miozän werden weite Festlandflächen geflutet und es entsteht eine offene Seeverbindung zwischen Indischem Ozean, Paratethys und Mediterran. Kleinasien wird erneut isoliert und Stammarten von *ammodytes* und *Montivipera* evolvieren in geographischer Isolation. Berechnete Divergenzzeit *Montivipera* vs. *Macrovipera* 15,3 Mio. Jahre. Fossilfunde nach Szyndlar & Rage 1999. „*Vipera aspis*-Komplex“ (Quadrate): Randecker Maar, Oggenhausen (beide MN 5-6), Vieux-Collognes (MN 4-5, nicht abgebildet). Fossile orientalischen Vipern aus MN 5 sind nicht belegt.

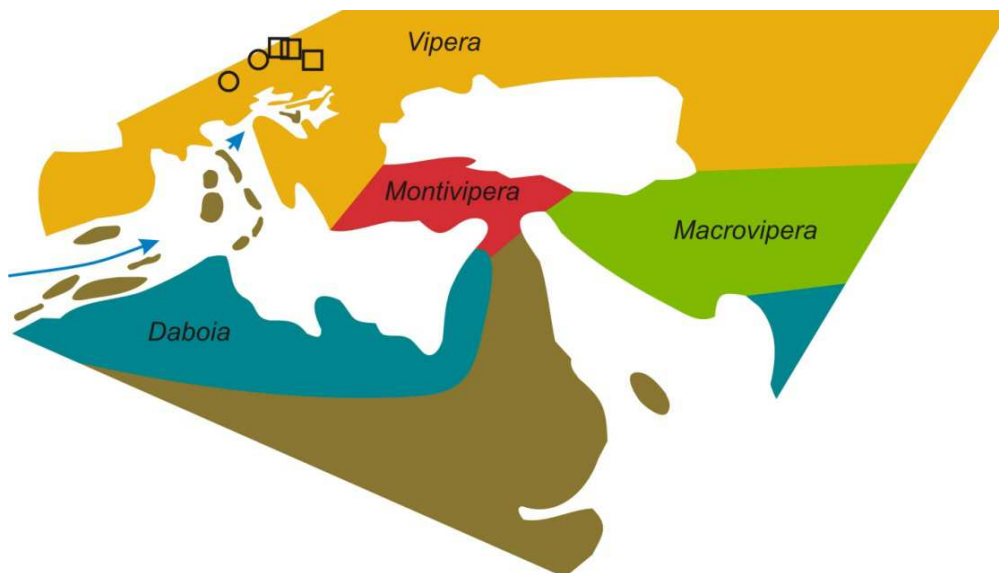


Abbildung 47: "Salinity crisis" der Paratethys im frühen Serravallium vor 15-14 Mio. Jahren, MN 6. Der Seeweg zwischen Mittelmeer und Indischem Ozean schließt sich durch Regression und tektonische Translation entlang der levantinischen Faltungszone. Eine Seeverbindung zum Atlantik bleibt bestehen (blaue Pfeile). Die Isolation von Kleinasien wird aufgehoben. Fossilfunde nach Szyndlar & Rage 1999. „*Vipera aspis*-Komplex“ (Quadrate): Randecker Maar, Oggenhausen (beide MN 5-6), Devínská Nová Ves (MN 6). Orientalische Vipern (Kreise): Sandelzhausen, Sansan (beide MN 6).



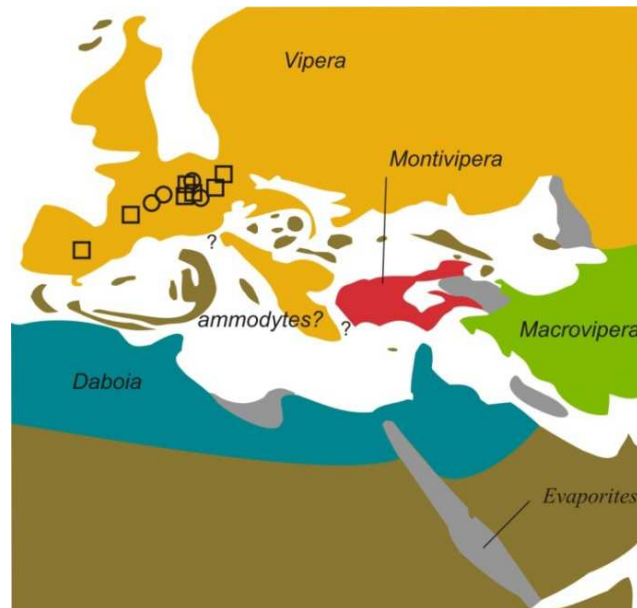


Abbildung 48: Paratethys und Mediterran im mittleren Miozän (Serravallium) vor 14-13 Mio. Jahren, MN 6,7,8 (ergänzt nach Popov et al. 2004). Die Paratethys wird zum letzten Mal vom Indischen Ozean geflutet. Das Mediterran bleibt vom Atlantik gespeist. Ablagerungen von Evaporiten zeigen das phasenweise Zurückweichen des Meeres im Bereich der östlichen und südlichen Paratethys. Stammarten von *Montivipera* wandern möglicherweise nach dem Zurückweichen des Meeres in das Gebiet des heutigen Iran ein. Fossilfunde nach Szyndlar & Rage 1999. „*Vipera aspis*-Komplex“ (Quadrate): Randecker Maar, Oggenhausen (beide MN 5-6), Devínská Nová Ves (MN 6), Opole, San Quirze, La Grive, Steinheim (alle MN 7-8) orientalische Vipern (Kreise): Sandelzhausen, Sansan (beide MN 6), La Grive, Steinheim (beide MN 7-8).

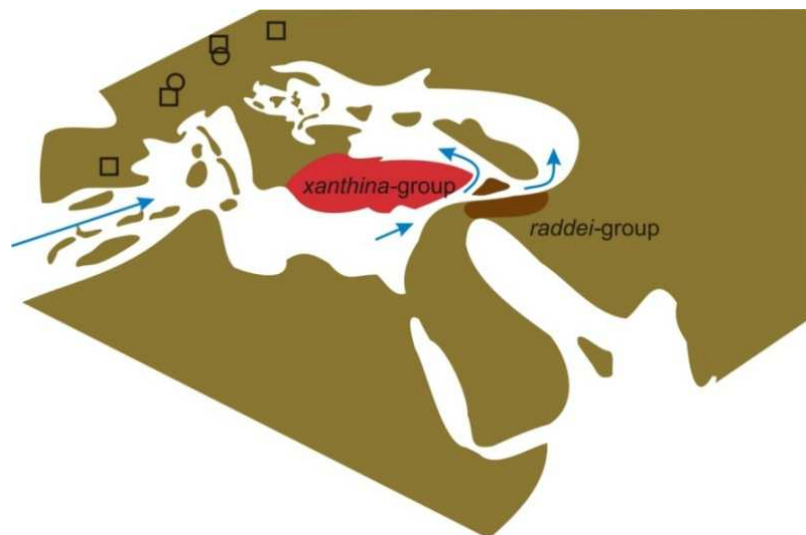


Abbildung 49: Paratethys und Mediterran im mittleren Miozän (oberes Serravallium) vor 13-12,2 Mio. Jahren, MN 7,8 (ergänzt nach Rögl 1999). Die offene Verbindung zwischen Paratethys und Indischem Ozean wird unterbrochen. Entlang der Bitlis-ostanatolischen Faltungszone bleibt jedoch eine schmale Seeverbindung (blaue Pfeile) zum Mediterran erhalten und separiert die Stammart von *Montivipera* in eine westliche und östliche Gruppe. Berechnete Divergenzzeit *Montivipera raddei* vs. *M. xanthina* 10,7 Mio. Jahre. Fossilfunde nach Szyndlar & Rage (1999). „*Vipera aspis*-Komplex“ (Quadrate): Opole, San Quirze, La Grive, Steinheim (alle MN 7-8) orientalische Vipern (Kreise): La Grive, Steinheim (beide MN 7-8).

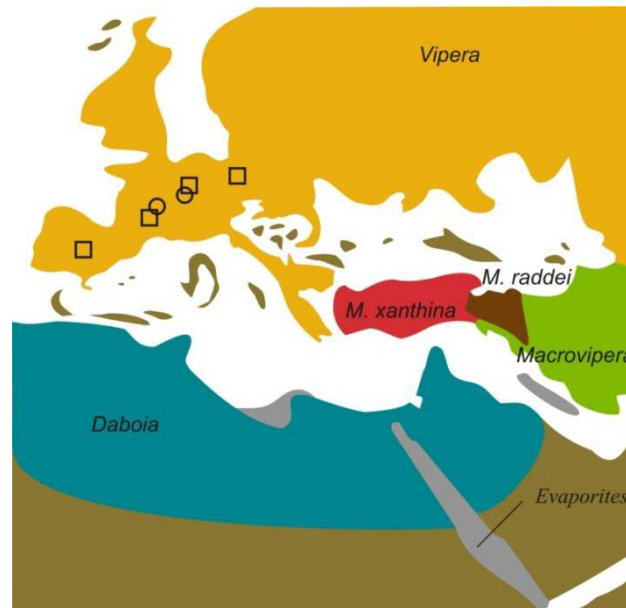


Abbildung 50: Paratethys und Mediterran im späten mittleren Miozän (spätes Serravallium, frühes Tortonium) vor 12-11 Mio. Jahren, MN 7-8 (ergänzt nach Popov et al. 2004). Entstehung des Ägäischen Meeres und der Pannonischen See. Die Paratethys wird weitestgehend vom Mediterran isoliert. Fossilfunde nach Szyndlar & Rage (1999). „*Vipera aspis*-Komplex“ (Quadrate): Opole, San Quirze, La Grive, Steinheim (alle MN 7-8) orientalische Vipern (Kreise): La Grive, Steinheim (beide MN 7-8).

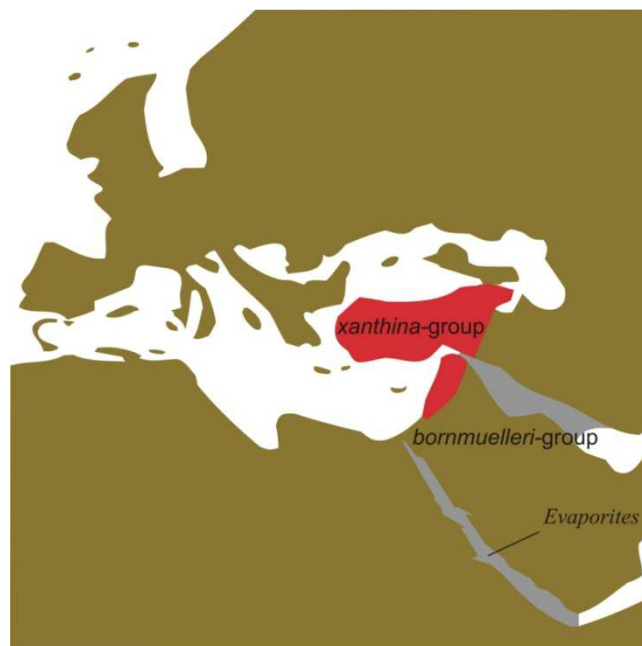


Abbildung 51: Paratethys und Mediterran im späten Miozän (Tortonium) vor 8,5-7 Mio. Jahren (ergänzt nach Popov et al. 2004). Ein Seeweg zwischen Persischem Golf und dem Golf von Iskenderun trennt die *bornmuelleri*- von der *xanthina*-Artengruppe. Berechnete Divergenzzeit zwischen *Montivipera wagneri* vs. *M. xanthina* 6,2 Mio. Jahre.

### 9.3 Diskussion

Mit dem beginnenden Zerfall des Gondwana-Superkontinents im mittleren Jura (~170 Mio. Jahre) trennte ein Grabenbruch die östliche Gondwana-Platte (Madagaskar-Seychellen-Indien-Antarktis-Australien) von der afrikanisch-südamerikanischen Platte. Durch die Westwärtsdrift Südamerikas begann in der frühen Kreide (~132 Mio. Jahre) die Öffnung des Südatlantik und eine völlige Loslösung von Afrika vor 110 Mio. Jahren. Bis zum Beginn des Miozäns (~23 Mio. Jahre) bestand keine kontinuierliche Landverbindung Afrikas zu einem laurasischen oder gondwanischen Kontinent (Gheerbrant & Rage 2006). In Verbindung mit Meeresschwankungen wurden Landengen zwischen Afrika und Laurasien in der Kreide und dem Paläogen immer wieder für terrestrische Organismen passierbar. Die Landrouten ermöglichten sowohl bi- als auch unidirektionalen transthethyschen Faunenaustausch (Gheerbrant & Rage 2006). Dennoch war Afrika für eine Zeitspanne von mindestens 75 Mio. Jahren bis zum Beginn des Miozäns biogeographisch isoliert. Das zeigt der hohe Endemismenanteil der afrikanischen Biostratigraphie.

Nach meinen Untersuchungen beziffert sich das Divergenzalter zwischen Grubenottern (Crotalinae) und echten Vipern (Viperinae) auf 49,4 Mio. Jahre und bestätigt damit die Berechnungen von Wüster et al. (2008), die das Alter des letzten unmittelbaren Vorfahren (MRCA) zwischen Viperinae und Crotalinae mit ca. 47,4 Mio. Jahren angeben (Max. 57,4 Mio. Jahre, Min. 38,1 Mio. Jahre). Damit liegt der Ursprung der Familie ungefähr auf der Grenze zwischen Paläozän und Eozän vor ~55,8 Mio. Jahren. Der Epochenwechsel ist gekennzeichnet durch einen abrupten Anstieg von Treibhausgasen (Kohlendioxid/Methan), in deren Folge sich das Weltklima dramatisch änderte (Zachos et al. 2001, 2008). Im Paläozän-Eozän-Wärme-Maximum (PETM) stieg die Oberflächentemperatur der Meere in den Tropen um 5 °C und in der Arktis um mehr als 6 °C an (Zachos et al. 2003) und löste damit den niedrigsten Äquator-Pol-Temperaturgradienten der letzten 55 Mio. Jahre aus (Moran et al. 2006). Der kurze aber abrupte Wechsel des Weltklimas war folgeschwer für die Biota, und begleitet von Massenextinktionen (Thomas 1998) und latitudinalen Verschiebungen von Verbreitungsarealen und Lebensgemeinschaften (Beard 2002, Bowen et al. 2002). So wurden die Säugetierfaunen aller nördlichen Kontinente und wahrscheinlich auch Afrikas durch ein dramatisches „Turn-over“-Ereignis verändert (Gheerbrant & Rage 2006, Novacek 1999, Woodburne 2004). Es ist durchaus vorstellbar, dass die klimatischen und zoogeographischen Veränderungen des PETM direkten oder indirekten Einfluss auf die Evolution der Stammlinienvertreter der Viperidae hatten. Im anschließenden Eozän hatten tropische und subtropische Floren die größte jemals festgestellte Ausdehnung und die homogenste holarktische Fauna (Woodburne 2004). Zu diesem Zeitpunkt waren die Stammlinienvertreter der Viperidae in Afrika und/oder Eurasien vermutlich weit verbreitet.



Die Evolution zweier morphologisch und genetisch so distinkter Gruppen wie die Crotalinae und Viperinae kann nur im Zuge einer lang andauernden Isolation durch vikariierende paläogeographische Ereignisse verlaufen sein.

Während Crotalinae holarktisch verbreitet sind und sowohl Südostasien (z.B. Gumprecht et al. 2004) als auch die Neotropis (z.B. Campbell & Lamar 1993) besiedeln, sind Viperinae ausschließlich in Afrika und Eurasien verbreitet (z.B. Phelps 2010). Molekulare Divergenzzeiten von Wüster et al. (2008) zeigen, dass die ältesten Linien der Crotalinae in Südostasien zu finden sind, während die Taxa der Neuen Welt auf Besiedlungswellen jüngerer Zeit zurückgehen. Der Ursprung der Crotalinae liegt somit in Süd- oder Südostasien. Strittig ist die Frage nach dem Ursprung der Viperidae, dem Stammlinienvertreter von Viperinae und Crotalinae. Nach der Dispersal-Vicariance-Analyse von Wüster et al. (2008) ist ein asiatischer oder asiatisch-afrikanischer Ursprung der Viperidae gleich wahrscheinlich. Die Autoren befürworten jedoch einen monokontinentalen Ursprung der Viperidae in Asien als am wahrscheinlichsten. Für die Beweisführung fehlt jedoch ein entsprechendes paläogeographisches Ereignis, das die Hypothese evaluiert. Auch die „Dispersal-Vicariance“-Analyse der vorliegenden Arbeit kann den Ursprung der Viperidae nicht eindeutig klären. Als alternative Erklärung gilt die Entstehung der Viperidae in Afrika, die ebenso wenig zu beweisen ist, allerdings mit geologischen Ereignissen korreliert werden kann.

Das Auseinanderbrechen der östlichen Gondwana, die Passage des Indischen Subkontinents sowie dessen Kollision mit dem asiatischen Kontinent sind strittige Fragen in der aktuellen tektonisch-paläogeographischen Diskussion (Ali & Aitchison 2008). In dem "Atlas of Earth History" von Scotese (2001) ist Indien auf der Passage durch den Indischen Ozean für mindestens 30 Mio. Jahre isoliert. Eine derart lange Isolation hätte zur Ausbildung endemischer Gattungen und Familien führen müssen, für die sich jedoch keine Fossilbelege finden lassen (Briggs 2003). Mehrfach wurde die Hypothese aufgeworfen, Indien sei das Bindeglied einer transtethyschen Landbrücke gewesen. Nach Chatterjee & Scotese (1999) hat es in der späten Kreide und im Paläogen eine Landverbindung, genannt "Greater Somalia", zwischen Indien und Ostafrika gegeben. Geehrbrant & Rage (2006) halten den Faunenaustausch über die genannte Route für plausibel, wenngleich sie betonen, die Hypothese sei nicht ausreichend bewiesen. Eine terrestrische Ausbreitung der Angiospermen von Afrika nach Indien zieht auch Mehrotra (2003) in Betracht. Bemerkenswert sind die kreidezeitlichen Fossilfunde vom indischen Subkontinent, die sowohl gondwanische (Krause et al. 1997, Sahni & Prasad 2009) als auch laurasische Faunenelemente (Prasad & Sahni 1999, Sahni & Prasad 2009) aufweisen, datiert auf eine Zeit, zu der sich Indien in absoluter Isolation im Ozean befunden haben soll. Rage (1996)

führt das rezente Verbreitungsmuster einiger Herpetofaunen auf eine spätkreidezeitliche Landverbindung zwischen Asien, Indien, Seychellen und Madagaskar zurück.

Ali & Aitchinson (2008) rekonstruieren die tektonische und paläogeographische Evolution des indischen Blocks vom mittleren Jura bis ins späte Eozän. Ihre Modellierung ist mit den meisten biogeographischen Hypothesen nicht kompatibel, bestätigt jedoch einen möglichen biogeographischen Kontakt zwischen Indien und Madagaskar in den letzten 15 Mio. Jahren der Kreide.

Ein aktueller Fossilfund von Prasad et al. (2010) nährt jedoch erneut die "Greater Somalia"-Hypothese von Chatterjee & Scotese (1999), nach der eine terrestrische Landverbindung in der späten Kreide und im Paläozän zwischen Afrika und Indien bestanden haben soll. Ihrer Argumentation folgend, ist das anzestrale Säugetier *Deccanolestes* aus Indien der Vorfahre von *Afrodon* aus Afrika und Europa und damit der erste Beweis für eine indo-afrikanische Ausbreitung im Paläozän. Nach Haq et al. (1987) fiel der Meeresspiegel vor 50 Mio. Jahren auf einen Tiefstand, der einen interkontinentalen Faunenaustausch zwischen Afrika und Laurasien ermöglichte.

Die Ausbreitung der Viperidae im Paläozän auf den indischen Subkontinent könnte zur Auftrennung der Stammart in Crotalinae und Viperinae geführt haben. Die Eroberung neuer Lebensräume mit freien Ressourcen könnte die Radiation sowie die Ausbildung apomorpher Merkmale wie dem Grubenorgan begünstigt haben. Bedingt durch die Nordwärtsdrift erscheint die Besiedlung des indischen Kontinents ausgehend von Afrika („out of Africa“) am plausibelsten. Erst nach der Kollision des indischen Subkontinents mit Asien, zum Ende des Eozäns vor ~33,9 Mio. Jahren (Ali & Aitchison 2008), begann die eigentliche Radiation der Crotalinae mit der Ausbreitung auf den laurasischen Kontinent. Die Hypothese korreliert mit den Divergenzzeitberechnungen von Wüster et al. (2008), wonach die Radiation rezenter Grubenottern vor etwas mehr als 30 Mio. Jahren begann. Überdies wird die These dadurch gestützt, dass mit *Hypnale hypnale* eine der ältesten evolutionären Linien (Wüster et al. 2008) rezenter Grubenottern den indischen Subkontinent bewohnt. Die Hypothese einer Landverbindung zwischen dem indischen Subkontinent und Arabien-Afrika halten Ali & Aitchison (2008) dagegen für unwahrscheinlich.

Viperinae haben nach Herrmann & Joger (1997) einen afrikanischen Ursprung. Der letzte unmittelbar gemeinsame Vorfahre zwischen afrikanischen und eurasischen Viperinae-Stammarten existierte nach vorliegenden Untersuchungen vor 38,3 Mio. Jahren und bestätigt damit die molekulare Schätzung von Wüster et al. (2008), die die Divergenzzeit der Viperinae mit 39,7 Mio. Jahren angeben.

Die Ergebnisse der molekularen Uhr lassen vermuten, dass im späten Eozän ein Landkorridor die Ausbreitung der Stammart nach Laurasien ermöglichte, denn bereits wenige Millionen Jahre später trennte ein Seeweg zwischen Tethys und Indopazifik den afrikanischen vom laurasischen Kontinent (Popov et al. 2004, siehe auch Abbildung 38), sodass sich die Biota beider Kontinente unabhängig voneinander entwickeln konnten. Das mutmaßliche Ausbreitungsereignis sowie die Divergenzzeit korrelieren in etwa mit einem eustatischen Meerestiefstand vor ca. 37 Mio. Jahren (siehe Abbildung 52). Durch die drastische Abkühlung des Weltklimas zum Ende des Eozäns bildeten sich die ersten polaren Eiskappen, die den Meeresspiegel durch Massenverlagerungen des Wassers absenkten (Zachos et al. 2008) und Migrationskorridore frei gaben.

Transtethysche Ausbreitungen zwischen Afrika und Laurasien lassen sich durch Fossilfunde beiderseits der Tethys für das Paläogen mehrfach belegen (Gheerbrant 1987, 1990, 2001). Nach Gheerbrant & Rage (2006) gab es im späten Eozän zwei kleinere Ausbreitungsereignisse zwischen Afrika und Laurasien, deren Zeitfenster mit der Trennung afrikanischer von eurasischer Vipern-Stammlinien zusammenfallen. Das frühere der beiden Ausbreitungsereignisse zwischen Lutetium und Bartonium ist nicht eindeutig belegt, während das zweite in der Transition zwischen Bartonium und Priboonium (~37,2 Mio. Jahre) wichtige laurasische Leitfossilien der afrikanischen Fauna enthält (Gheerbrant & Rage 2006). Amer & Kumazawa (2005) berechneten die Divergenzzeiten zwischen eurasischen und afrikanischen Agamen der Gattung *Uromastix*. Nach ihren Schätzungen wurden die beiden Gruppen vor 29-24 Mio. Jahren separiert, deutlich vor der Ausbildung der *Gomphotherium*-Landbrücke, zu einem Zeitpunkt, der keinen geologischen Hinweis auf ein vorheriges Ausbreitungsereignis liefert, als beide Kontinente durch einen Seeweg getrennt waren (siehe Popov et al. 2004).

Die Aufspaltung eurasischer Vipern vor 29,8 Mio. Jahren in eine kältetolerante Gruppe (Stammarten der rezenten Gattung *Vipera*) und eine mediterran subtropisch verbreitete Gruppe (orientalische Vipern) fällt in einen Zeitraum globaler klimatischer Abkühlung (z.B. Mosbrugger et al. 2005), infolgedessen sich die Stammarten laurasischer Viperiden an subtropische Klimate mit jahreszeitlichen Temperaturschwankungen anpassen mussten (vergl. Abbildung 52). In einem Zeitraum von fünf Mio. Jahren sank die Jahresdurchschnittstemperatur in Mitteleuropa vom Priboonium (37,2-33,9 Mio. Jahre) bis Rupelium (33,9-28,4 Mio. Jahre) von maximal 21°C auf 17°C (Mosbrugger et al. 2005). Damit einher ging die Abnahme der Niederschlagsmengen. Der gravierende Klimawechsel im Bereich der Eozän/Oligozän-Grenze, auch bekannt als terminales eozänes Klima-Ereignis (TEE), korreliert mit einem Wandel der Vegetation von eozänen Waldlandschaften

hin zu offenen steppenartigen Lebensräumen im Oligozän (Meng & McKenna 1998). Weltweit niedrige Temperaturen der Kaltzeit haben zur Reorganisation (Novacek 1999, Pascual 2006) und allopatrischen Speziation (Hooker et al. 2004) der Biota geführt. In Folge des TEE kam es in Europa („Grande Coupure“) und Mittelasien („Mongolian Remodelling“) zum „Turn-over“, bei dem lokal bis zu 82% der Säugerfauna ausstarb (Meng & McKenna 1998). So wurde, beeinflusst durch den Klimawandel, die von Perissodactyla dominierte eozäne Fauna abrupt durch nager- und hasenartige Faunen des Oligozäns ersetzt (Meng & McKenna 1998).

Das als „Mongolian Remodelling“ bezeichnete Ereignis korreliert mit der allopatrischen Radiation laurasischer Vipern in eine nördlich verbreitete europäische Stammlinie und eine südlich verbreitete orientalische Schwesterlinie.

Ausschlaggebend für die Trennung der beiden Stammgruppen könnte die allmählich einsetzende Aridisierung Kontinental-Asiens (Dupont-Nivet et al. 2007) in der Eozän-Oligozän-Transition gewesen sein. Das Tarim-Becken Zentralasiens, eine geomorphologische Senke, dürfte hierbei vikariierende Wirkung gehabt haben. Die molekulare Datierung reflektiert den Faunen-turn-over sowie die organismische Reorganisation, ausgelöst durch die Abkühlung des Weltklimas.

Von entscheidender Bedeutung für die Evolution der kleinasiatischen Biota ist die, sich in geologischer Zeit mehrfach wiederholende, Insellage zwischen Tethys und Paratethys, die zur Ausbildung einer charakteristischen Inselfauna mit hoher Endemitenzahl geführt hat.

Durch die Anhebung des Elburz-Kopetdag-Massivs im frühen Oligozän vor 34-32 Mio. Jahren wurde eine Landverbindung zum anatolisch-aurisch-pontischen Land hergestellt, über die Stammlinienvertreter der heutigen orientalischen Vipern (*Macro-* und *Montivipera*) das Gebiet des heutigen Kleinasien erreichten, bis das Gebiet im späten Oligozän (29-24 Mio. Jahre) durch einen Seeweg vom laurasischen Festland getrennt wurde. Kleinasien blieb dann als Insel bis zum frühen Miozän für mindestens 10 Mio. Jahre isoliert (Popov et al. 2004). Die geschätzte zeitliche Divergenz (26,7 Mio. Jahre) zwischen den Stammlinienvertretern von *Macro-*, *Montivipera* und *Daboia* ist in hoher Übereinstimmung mit den vikariierenden geologischen Ereignissen.

Antunes & Rage (1974) beschreiben einen einzelnen Wirbelfund einer orientalischen Viper aus Lissabon, den sie der Säugerzone MN3 zuordnen. Die Rekonstruktion des paläobiogeographischen Szenarios lässt zwei Schlussfolgerungen zu: Stammt der Fund aus dem frühen Burdigalium (erste Hälfte MN3), kann es sich bei dem fossilen Wirbel nur um einen Ahnen von *Daboia* handeln, da Kleinasien zu diesem Zeitpunkt noch eine Insel war.

Ist er jedoch auf die zweite Hälfte von MN3 datiert, könnte es sich sowohl um die Ahnen von *Daboia* als auch um Stammarten von *Macro-* und *Montivipera* handeln.

Nach Popov et al. (2004) verhinderte ein offener Seeweg zwischen Tethys und Indopazifik vom Oligozän bis zum Beginn des frühen Miozäns Migrationen terrestrischer Organismen zwischen Afrika und Asien. Erst die Kollision der afro-arabischen Platte mit der anatolischen Platte führte wiederholt zur Entstehung von Landbrücken zwischen Afrika und Laurasien (Rögl 1999). Die neu entstandenen Korridore erlaubten Austausch zwischen gondwanischen und laurasischen Faunen. Elefantenähnliche Fossilfunde aus Pakistan (Antoine et al. 2003) lassen vermuten, dass ein kurzzeitiger Korridor die beiden Kontinente erstmals im Aquitanium (23-20 Mio. Jahre) verband. Die eigentliche Migrationswelle setzte jedoch erst im Burdigalium vor 20-16 Mio. Jahren ein (Harzhauser et al. 2007). Zu den ersten Immigranten, die sich zum Ende der Säugerzone MN3, zwischen 19 und 18,5 Mio. Jahren, von Afrika nach Europa ausbreiteten, zählen *Gomphotherien*, *Deinotherien* und Mastodonten (Mein 1999, Tassy 1989, Koufos et al. 2003). Kurze Zeit später (18-17,5 Mio. Jahre, MN4) erschienen in einer zweiten Migrationswelle Amelodontiden in Europa (Steininger 1999). Gleichzeitig mit den ersten Probosciden breiteten sich weitere Säugetiere in beide Richtungen über die *Gomphotherium*-Landbrücke aus (van der Made 1999).

Interkontinentale Migrationen führen zum Austausch oder der „Einbürgerung“ unabhängig evolvierter Arten in neue Lebensgemeinschaften. Die Neuankömmlinge lösen dynamische Veränderungen in den etablierten Lebensgemeinschaften aus, in deren Folge Speziationsprozesse ausgelöst werden, Arten aussterben („Turn-over“) oder einfach die Artenvielfalt ansteigt (Vermeij 1991). Landbrücken sind im Känozoikum durch fallenden Meeresspiegel infolge der Abkühlung des Weltklimas mit einsetzender Vergletscherung mehrfach entstanden (z.B. Voris 2000) (siehe Abbildung 52).

Der Effekt der *Gomphotherium*-Landbrücke auf die Ausbreitung von ektothermen Vertebraten wurde durch Böhme (2003) untersucht und bestätigt die Passierbarkeit der Landbrücke in zwei Zeitfenstern. So nutzten Squamaten mit afrikanischem Ursprung die Passage zur Ausbreitung gen Norden. Fossile Chamaeleonidae tauchten erstmals zum Ende der Säugerzone MN2/MN3 in europäischen Fossilienlagerstätten auf, während Cordylidae von einem noch späteren Zeitpunkt, dem Beginn der Säugerzone MN4, nachweisbar sind.

Gut dokumentiert ist der Einfluss der Landbrücke auf die Verbreitung und die Speziation bei den Giftnattern. So sind die ältesten Fossile der Gattung *Naja* mit autapomorphen Merkmalen asiatischer Kobras (Szyndlar & Rage 1990) erst kurze Zeit nach dem Kollaps der *Gomphotherium*-Landbrücke entstanden (Wüster et al. 2007).

Auch wenn Fossilfunde aus dem Vorderen Orient und Nordafrika als direkter Nachweis von Ausbreitungsereignissen fehlen, liefert die hohe Koinzidenz zwischen Divergenzzeiten, Phylogenie und rezenter Verbreitung einen klaren Hinweis auf die Bedeutung der Landbrücke auch für die orientalischen Vipern. Nach den paläobiogeographischen Rekonstruktionen nutzten die Stammarten von *Daboia* und von *Macro-* und *Montivipera* die *Gomphotherium*-Landbrücke zur Ausbreitung in neue Areale.

Die genetische Trennung der beiden evolutionären Linien *Daboia mauritanica* vs. *D. russelii* datiert die molekulare Uhr auf 18,9 Mio. Jahre, einem Zeitpunkt an dem die physische Unterbrechung der Landroute noch nicht vollzogen war. Vermutlich trennt ein Seeweg zwischen Persischem Golf und Mediterran die Landroute erst vor 17,3 Mio. Jahren (Rögl 1999).

Auch die Stammart von *Macro-* und *Montivipera* breitete sich über denselben Landweg nach Vorderasien aus und kolonisierte erstmals auch Mittel- und Westeuropa, bis die Korridore im mittleren Miozän (Langhium zwischen 16 und 15 Mio. Jahren) infolge einer Transgression geflutet wurden und eine offene Seeverbindung zwischen Indischem Ozean, Paratethys und Mediterran entstand (Popov et al. 2004) (vergl. auch Abbildung 46). Kleinasien wurde für ca. eine Mio. Jahre isoliert, bevor im frühen Serravallium erneut Landverbindungen zwischen Europa, Asien und Nordafrika entstanden. Stammarten von *Macrovipera* und *Montivipera* evolvierten im Langhium unabhängig voneinander in geographischer Isolation und möglicherweise unter unterschiedlichen extrinsischen Bedingungen.

Die initiale Trennung der beiden evolutionären Linien *Montivipera*, *Macrovipera* im Langhium vor 16-15 Mio. Jahren, koinzidiert mit vikariierenden geologischen Ereignissen, wurde aber vermutlich auch durch ökologische Shifts der Umwelt unterstützt. Zum Ende des klimatischen Optimums im mittleren Miozän (MMCO) vor 14 Mio. Jahren expandierten temperierte Grasländer (Badgley et al. 2005, van Dam 2006, Fortelius et al. 2006). C-3 dominierte Wälder wurden von C-4 dominierten Grasländern abgelöst (Badgley et al. 2008). Mit dem Wechsel der Lebensräume wurden fruchtfressende Säuger von grasenden Arten ersetzt (Badgley et al. 2008). In dieser Phase passte sich die Stammart der Levanteottern möglicherweise an Steppenbiotope an und setzte sich so in ihren ökologischen Ansprüchen von ihrer Schwesterart ab. Nachdem im oberen Serravallium die östliche Anbindung Kleinasiens an das laurasische Festland erneut unterbrochen wurde, bewirkte die Nordwärtsbewegung der arabischen Platte eine Anhebung des Bitlis-Kollisionsgürtels um 1,5 bis 2 km und formte das türkisch-iranische Plateau (z.B. Faccenna et al. 2006). Bedingt durch die tektonische Anhebung entwickelte sich in den Hochlagen ein Höhenklima, das spätestens seit dem Serravallium Ahnen der heutigen Gattung *Montivipera* zur Anpassung

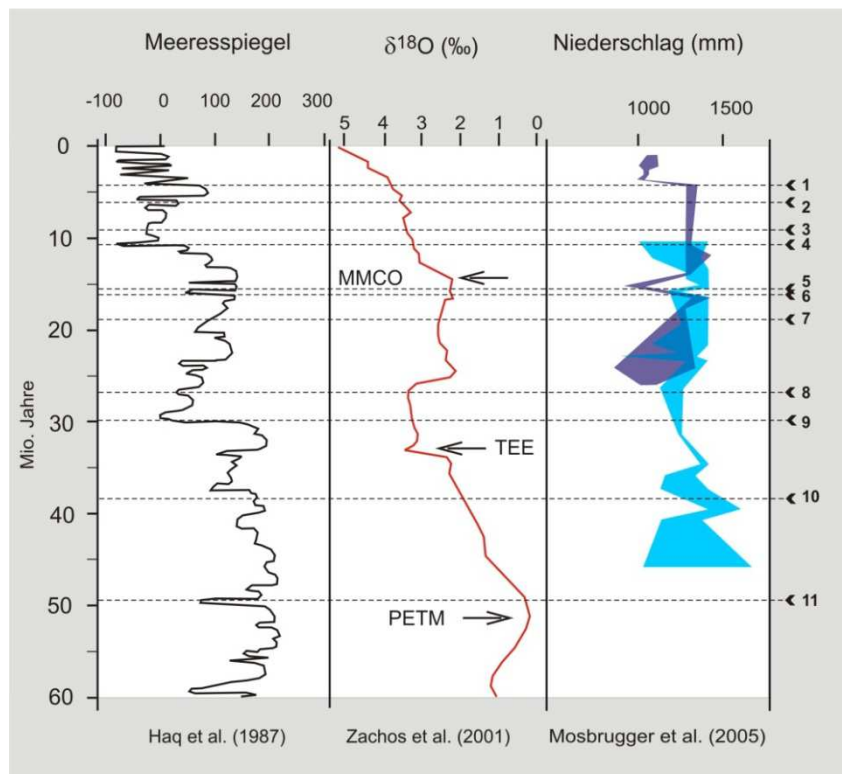


Abbildung 52: Divergenzzeiten (gestrichelte Linien) wichtiger Kladen des Datensatzes 5434 aufgetragen gegen Meeresspiegel und Paläo-Klimaelemente (Deep-Sea-Oxygen ( $\delta^{18}\text{O}$  (‰)), Niederschlag (mm)) (verändert nach Haq et al. (1987), Zachos et al. (2001), Mosbrugger et al. (2005)). Ozeantemperaturen wirken sich auf das Isotopenverhältnis des Sauerstoffs ( $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ ) in der Kalkschale von Foraminiferen aus. Bei geringen Temperaturen wird vermehrt das schwerere Isotop  $\text{O}^{18}$  eingebaut. 11: MRCA Viperidae, 10: MRCA Afrika/Asien, 9: Splitt Vipera/Orientalische Vipern, 8: Splitt Daboia/Monti-, Macrovipera, 7: Splitt mauritanica/russellii, 6: Splitt ammodytes/bosniensis, 5: Splitt Montivipera/Macrovipera, 4: Splitt Montivipera raddei/M. xanthina, 3: Splitt Vipera orlovii/V. bosniensis, 2: Splitt Montivipera xanthina/M. wagneri, 1: Splitt Macrovipera lebetina turanica/M. lebetina obtusa. PETM: Paleocene-Eocene-Thermal-Maximum, TEE: Terminal-Eozene-Event, MMCO: Mid-Miocene-Climatic-Optimum.

an den neuen Lebensraum zwang und sich so neben der geographischen Trennung auch eine ökologische Trennung der beiden evolutinären Schwesterlinien vollzog, die bis in die heutige Zeit anhält. *Macrovipera lebetina* besiedelt nur die warmen Tallagen des türkischen Plateaus bis zu einer Höhe von maximal 1700 m ü NN (z.B. Ščerbak & Böhme 2005), während *Montivipera*, von wenigen Ausnahmen abgesehen, montane und alpine Gebirgszonen bis 3000 m ü NN bewohnt (z.B. Nilson & Andrén 1986a).

Fossilfunde anderer Viperiden aus Mitteleuropa bestätigen die Hypothese, dass sich Stammarten von *Montivipera* im Langhium endemisch in Kleinasien entwickelt haben. Aus der Säugerzone MN 5 (spätes Burdigalium, Langhium) sind ausschließlich Stammarten der Gattung *Vipera* fossil überliefert, während orientalische Vipern in Lagerstätten Mitteleuropas

fehlen (Szyndlar & Rage 1999), einem Zeitfenster, in dem in Europa die höchsten Durchschnittstemperaturen des Miozäns herrschten (Mosbrugger et al. 2005). Orientalische Vipern tauchen erst wieder in der Säugerzone MN 6 des frühen Serravalliums in Europa auf. Im späten Serravallium formte sich der Balkan erstmals und Kleinasien wurde erneut zu einer Insel im Protomediterran (Popov et al. 2004).

Aus Europa sind von mehreren Fossilienlagerstätten sowohl Stammarten von *Vipera* als auch von orientalischen Vipern aus den Säugerzonen MN 6-8 belegt (Szyndlar & Rage 1999). Das gleichzeitige Auftreten der ökologisch verschiedenen Gruppen *Vipera* und der orientalischen Vipern in den europäischen Fossilienlagerstätten stellt möglicherweise einen Widerspruch dar. Im mittleren Serravallium kühlte sich das Weltklima durch eine Kaltzeit dramatisch schnell ab (Zachos et al. 2001). Die Durchschnittstemperatur der kältesten Monate fiel in Mitteleuropa unter 4 °C (Mosbrugger et al. 2005). Die Klima-Transition korreliert mit Aussterbeereignissen zahlreicher Biota. Böhme (2003) konnte nachweisen, dass thermophile Krokodile (*Diplocynodon*), Schildkröten (*Geochelone*) und Chamäleons (Chamaeleonidae) den Klimawechsel im Serravallium nicht überlebten und aus europäischen Fossilienlagerstätten verschwanden. Ahnen eurasischer Viperiden scheinen sich nach Fossilüberlieferungen den Klimaänderungen angepasst zu haben. Seit dem späten Burdigalium sind orientalische Vipern und Ahnen des *Vipera aspis*-Komplexes, mit Ausnahme des Langhiums (MN 5), permanent in den Fossilienlagerstätten Europas vertreten. Weil sich die Ahnen der Gattung *Montivipera* über lange Zeiträume (Langhium und Serravallium) in geographischer Isolation entwickelt haben, können die mitteleuropäischen Fossile keine direkten Ahnen der rezenten Gattung *Montivipera* gewesen sein. Sie repräsentieren eine ausgestorbene Seitenlinie von *Montivipera* oder Stammlinien von *Macrovipera*.

Im mittleren Serravallium trennte ein Seeweg das Areal der *Montivipera*-Stammart in ein westliches und östliches Verbreitungsgebiet. Die molekulare Divergenz zwischen den beiden Schwesterkladen *Montivipera xanthina* und *M. raddei* (10,7 Mio. Jahre) korreliert ungefähr mit der Entstehung des Seeweges entlang der Bitlis-ostanatolischen Faltungszonen vor 13-12,2 Mio. Jahren (Popov et al. 2004). Ein äquivalentes Verbreitungsmuster mit Trennung in eine westanatolische und ostanatolische Gruppe durch die anatolische Diagonale zeigen auch andere Biota. Gvoždík et al. (2010) fanden unter ostmediterranen Laubfröschen eine geographische Haplotypenverteilung, die derjenigen von west- und ostanatolischen Bergottern entspricht.

Fossile orientalische Vipern aus dem mittleren und späten Serravallium sind taxonomisch nur bedingt klassifizierbar. Im späten Serravallium ist Kleinasien von Europa durch das Ägäische Meer getrennt, sodass mitteleuropäische und asiatische Bergottern geographisch



und genetisch voneinander getrennt waren und möglicherweise unterschiedlichen Arten angehörten.

Innerhalb der *xanthina*-Gruppe lässt sich der Split zwischen den Artengruppen *Montivipera bornmuelleri* und *M. xanthina* mit einem geologischen Ereignis im Tortonium korrelieren. Ein Seeweg zwischen Persischem Golf und Mediterran (Popov et al. 2004) trennte die levantinischen von den anatolischen Bergottern vor 8,8 bis 7 Mio. Jahren. Der letzte gemeinsame Vorfahre zwischen *M. xanthina* und *M. wagneri* trennte sich nach vorliegenden Berechnungen vor 6,2 Mio. Jahren. Demzufolge muss der Split zwischen *M. xanthina* und *M. bornmuelleri* etwas älter sein.

Klimatische Warmzeiten und geodynamische Prozesse haben gleichermaßen zur Ausbreitung und Vikarianz der Viperiden im Mittelmeerraum beigetragen.

Nach der vorherrschenden Meinung sind geographische Faktoren die entscheidenden Kräfte allopatrischer Speziation (z.B. Futuyma 1998). Disjunkte Verbreitungsareale nah verwandter Taxa werden auf „Dispersal“- oder „Vicariance“-Ereignisse zurückgeführt.

Darlington (1957, 1965), ein Vertreter der „Dispersal“-Hypothese, erklärt disjunkte Verbreitungsareale damit, dass sich Organismen ausgehend von einem „Center of Origin“ über bereits bestehende geographische oder geologische Barrieren ausdehnen und später durch diese isoliert werden. Nach der „Vicariance“-Hypothese sind disjunkte Areale die Folge historischer Art-Aufspaltungen durch geodynamische Prozesse. Ausbreitungsszenarien mit der Kolonisation neuer Areale über lange Distanzen („Long-distance-dispersal“) oder seltene zufällige Landrouten („Sweepstakes“) sind nach dieser Hypothese nicht vorausgesetzt (Simpson 1940). Nach der strikten Auslegung der „Vicariance“-Hypothese spiegeln kladistische Beziehungen zwischen verwandten Taxa die historischen Beziehungen zwischen geographischen Regionen.

Der rasch anwachsende Datensatz molekularer Paläobiogeographien liefert jedoch überzeugende Anhaltspunkte, dass „Dispersal“ eine ebenso entscheidende Rolle bei der allopatrischen Speziation gespielt hat wie Vikarianz (Sanmartín et al. 2001, Sanmartín & Ronquist 2004, de Queiroz 2005, McGlone 2005, Yoder & Nowak 2006, Barker et al. 2007).

Vikarianz beginnt, wenn eine sich verändernde Umwelt Bedingungen im Verbreitungsareal einer Art schafft, die nicht mehr denen der ancestralen ökologischen Nische entsprechen (Wiens 2004). Unter den neuen biotischen und abiotischen Bedingungen können die Individuen nicht persistieren oder sich ausbreiten und das Areal wird fragmentiert. Vier Faktoren halten die ancestrale Nische aufrecht und limitieren lokale Adaptation während der Vikarianz: Das Fehlen organismischer Variabilität, natürliche Selektion, Pleiotropie und

Genfluss. Der offensichtlichste Grund ist die fehlende organismische Variabilität (z.B. Bradshaw 1991), die die Voraussetzung zur Anpassung an neue Lebensraumbedingungen darstellt und selbst der natürlichen Selektion unterliegen kann. Unter Berücksichtigung, dass intrinsische Merkmale das Potential haben zu evolvieren, sollte natürliche Selektion die ancestrale ökologische Nische konservieren (Holt & Gaines 1992). Wird die Fitness außerhalb der ancestralen Nische reduziert, werden Eigenschaften selektiert, die die ancestrale Nische favorisieren. Toleranz gegenüber neuen Lebensraumbedingungen unterliegt damit negativer Selektion. Genetische Mechanismen wie die Pleiotropie, bei dem ein Gen auf zwei unabhängige Merkmale (z.B. Fekundität und Anpassungsfähigkeit) einwirkt, können sich als Trade-off negativ auf die Evolution von Adaptation auswirken. Überdies kann Genfluss zwischen dem Zentrum des Verbreitungsgebietes und seiner Peripherie lokale Anpassungen an neue Lebensräume erschweren. Das Zusammenwirken aller Faktoren verhindert lokale Anpassungen an abweichende Lebensraumbedingungen in der Arealperipherie. Sie sind die Basis für phylogenetischen Nischen-Konservatismus und Vikarianz (Wiens 2004).

Die gleichen Prozesse liegen der allopatrischen Speziation durch Ausbreitungs-Ereignisse („Lineage-splitting via dispersal“) zugrunde. Nischen-Konservatismus limitiert Genfluss zwischen Kolonisten und Individuen aus dem Zentrum des Ursprungs (Wiens 2004).

Die Verbreitung von Arten ist neben ökologischen Faktoren auch stark von der historischen Demographie und von der räumlichen Nähe bewohnbarer Lebensräume abhängig (Avice 2004). Durch Ausbreitung werden neue Lebensräume mit ähnlichen ökologischen Bedingungen kolonisiert.

Obwohl Organismen nahezu jeden Lebensraum in der Biosphäre bewohnen, zeigen die meisten Arten nur geringe Toleranz gegenüber ökologischen Faktoren und besetzen nur bestimmte ökologische Nischen (Wiens 2004, Avice 2004).

Geographische Verbreitungsgrenzen von Arten werden durch ökologisch extrinsische Faktoren sowie durch intrinsisch organismische Faktoren vorgegeben (z.B. Brown & Lomolino 1998, Wiens 2004). Grenzen von Verbreitungsarealen sind dynamischen Prozessen unterworfen. Lyell erkannte bereits (1832, zitiert in Lieberman 2002), dass Ausbreitung und Vikarianz oszillierend miteinander wechseln.

Klimaänderungen und geotektonische Plattenverschiebungen des Erdmantels haben in erdgeschichtlichen Zeiträumen Verbreitungsgebiete von Organismen verändert. Klimawechsel verändern daher entsprechend der organismischen Toleranz die geographische Größe und Lage von Arealen (z.B. Gould & Eldredge 1977, Graham 1996). Postuliert wurden Zusammenhänge zwischen Arealveränderungen und Klimaelementen wie

Temperatur (Root 1988), Luftfeuchte (Eronen & Rook 2004) sowie Orbitalschwankungen (Jansson & Dynesius 2002), Saisonalität (Graham & Mead 1987) und Artinteraktionen (Kaufman 1995).

Arten reagieren innerhalb ihres Verbreitungsareales unterschiedlich auf Klimaänderungen. In Arealrandlagen, wo Arten an der Grenze ihrer intrinsischen Toleranz leben, wirken sich geringe Veränderungen der biotischen und abiotischen Umwelt gravierend auf die Fitness aus (Kühnelt 1943, Böhme 1978). Gegenwärtige Arealveränderungen können daher am ehesten an Arealgrenzen wahrgenommen werden. Fossilnachweise können aufgrund fehlender zeitlicher und geographischer Vollständigkeit Arealveränderungen insbesondere in Randlagen nur ungenau abbilden.

Bedingt durch den phylogenetischen Nischen-Konservatismus fehlt Arten die Fähigkeit, sich in kurzen Zeiträumen neuen ökologischen Bedingungen anzupassen (Wiens 2004). Negative Klimaveränderungen führen dazu, dass Arten nur noch in Reliktlebensräumen überdauern, die den ökologischen Bedingungen der ancestralen ökologischen Nische entsprechen. Der Prozess führt zur Fragmentierung von Artarealen und zur Aufspaltung von Populationen. Reliktareale konzentrieren sich häufig auf Regionen hoher Reliefenergie, die durch Höhenstufenzonierungen und den vertikalen Temperaturgradienten eine Vielzahl unterschiedlicher Klimastufen aufweisen. Die disjunkte Verbreitung von *Vipera latastei* und *monticola* in Nordafrika (Brito et al. 2006) sowie die Reliktverbreitungen von *Vipera ursinii* (Dely & Joger 2005) in Europa sind Zeugen einer ehemals weiteren Verbreitung der Arten in klimatischen Kaltzeiten.

Paläo- und biogeographische Studien sind nach Lieberman (2003, 2002, 2000) anfällig für artifizielle Inkongruenz, weil im Laufe der Zeit die Biota einer Region ihr Erscheinungsbild durch mehrfache Extinktionen geändert haben (Lieberman 2003), oder lang anhaltende Veränderungen der Umwelt zu unidirektionalen, morphologischen Änderungen fossiler Überlieferungen führen (Simpson 1951). Besonders betroffen von artifiziellen Inkongruenzen sind nach Lieberman (2002) alte Kladen mit hoher Extinktionswahrscheinlichkeit. Wiley & Mayden (1985) und Brooks & McLennan (1991) schlussfolgern daher, dass nur geologisch junge Organismengruppen für phylogenetisch biogeographische Analysen verwendet werden sollten.

Die Qualität des Fossilrekordes hat nach Lieberman (2002) einen ähnlichen Effekt auf paläobiogeographische Analysen wie die Akkumulation von Aussterbeereignissen. Fossilüberlieferungen sind naturgemäß unvollständig. Das Fehlen fossiler Gruppen in bestimmten geologischen Zeitintervallen kann paläobiogeographische Rekonstruktionen in die Irre führen.

Die Linie der Viperiden ist fossil nur bis zum Beginn des Miozäns zurückverfolgbar. Die ältesten bekannten Viperidenfossile der Alten Welt stammen aus dem frühen Miozän (Szyndlar & Rage 1999). Ihre systematischen Beziehungen zu den rezenten Artengruppen sind kaum mit Sicherheit feststellbar. Chkhikvadze (1985) berichtet von zwei fossilen Viperiden aus Zentral-Asien. Einer kleinen Art der Subgattung *Pelias* und einer großen *xanthina* ähnlichen Art. Ebenfalls aus dem frühen Miozän stammen *Provipera boettgeri* aus Hessler (Kinkelin 1892), *Vipera antiqua* aus Weisenau (Szyndlar & Böhme 1993) sowie *V. antiqua* ähnliche Fundstücke aus dem St-Gérard-le-Puy-Komplex in Frankreich.

Nach Hedges & Kumar (2004) unterschätzt der Fossilrekord die tatsächliche Divergenz zweier Linien immer erheblich.

Die vorliegenden Ergebnisse sind mehr als tentative Hypothesen zu paläobiogeographischen Szenarien einer Tiergruppe, weil sich die berechneten Divergenzzeiten stark mit geodynamischen Ereignissen decken. Darüber hinaus beweist die hohe Korrelation indirekt auch die Zuverlässigkeit der verwendeten Kalibrierungspunkte von Benton & Donoghue (2007). Durch den Verzicht von Kalibrierungspunkten innerhalb der Viperiden, konnten die Divergenzzeiten unabhängig und frei von Zirkelschlüssen berechnet werden.

Die Rekonstruktion der historischen Biogeographie findet jedoch nicht nur Antworten auf die Ausbreitungsszenarien und Speziationsprozesse der eurasischen Viperiden, sondern wirft im Hinblick auf die taxonomische Identifizierung und Paläoverbreitung von Fossilien weitere Fragen und Hypothesen auf:

➤ Die heutigen ökologischen Ansprüche und die Verbreitung eurasischer Viperinae lässt Zweifel an der syntopen bzw. sympatrischen Verbreitung fossiler Taxa aufkommen.

Die von Szyndlar und Rage (1999) erläuterten Fossilfunde zeigen über große geologische Zeiträume syntope bis sympatrische Verbreitungen zwischen Arten des „*Vipera aspis*-Komplexes“ mit orientalischen Vipern.

Der Schlüssel zum Verständnis der paläobiogeographischen Verbreitungsszenarien und Speziationshypothesen liegt in der Biogeographie rezenter Viperiden begründet. Alle westpaläarktischen Viperinae sind allopatrisch oder parapatrisch verbreitet (z.B. Bruno 1984). Ihre Verbreitungsareale überlappen, wenn überhaupt, nur partiell auf kleinräumiger geographischer Ebene. Durch extrinsische und intrinsische Faktoren sind die Arten klar voneinander getrennt (siehe oben). Syntope Vorkommen mit dauerhaft koexistierenden Arten sind nicht bekannt. Fehlende oder eingeschränkte präzygotische und postzygotische

Fortpflanzungsbarrieren zwischen Arten mit ähnlicher ökologischer Präferenz verhindern syntope oder sympatrische Verbreitung.

Die wenigen bekannten syntopen Vorkommen sind ausnahmslos auf ökologische und klimatische Transitionszonen zwischen Flachland- und Gebirgsregionen beschränkt. Der Einfluss des Gebirgsreliefs auf das Lokalklima kann das Aufeinandertreffen zweier Arten mit unterschiedlichen ökologischen Präferenzen begünstigen. Klimafaktoren sind in Gebirgen kleinräumig abgewandelt und erzeugen auf engstem Raum bedeutende lokalklimatische Unterschiede. Arten mit unterschiedlichen ökologischen Präferenzen können sich aufgrund der spezifischen klimatischen Voraussetzungen in Gebirgen räumlich begegnen und syntop vorkommen.

Auf der Iberischen Halbinsel treffen sich die drei Arten *Vipera latastei*, *Vipera aspis* und *Vipera seoanei* (Martínez-Freiria et al. 2009). Im Kantabrischen Gebirge konkurrieren die drei Arten um ökologische Nischen und erzeugen in syntopen Vorkommen natürliche Hybride. Natürliche Hybridpopulationen zwischen der Hornotter und der Kreuzotter wurden in den rumänischen Waldkarpaten entdeckt (Ghira 1992) und in mehreren Filialgenerationen unter artifiziellen Bedingungen trotz unterschiedlicher Chromosomenzahl gezüchtet (F. Wallner mündlich). Die Liste der Hybridzuchten innerhalb der Gattung *Vipera* ist lang und beinhaltet fast jede Artkombination. Auch die Spezies der Gattung *Montivipera* können fertile Hybride miteinander erzeugen. Bastarde zwischen *Montivipera xanthina* und *M. wagneri* wurden bis zur F<sub>2</sub> Generation gezüchtet (Stümpel unpubliziert). Selbst Kreuzungen zwischen verschiedenen Gattungen (*Montivipera wagneri* x *Macrovipera schweizeri*) sind möglich, obgleich die Fruchtbarkeit dann herabgesetzt ist (Stümpel unpubliziert).

In Kleinasien und dem europäischen Teil Thrakiens lassen sich die Verbreitungen und ökologischen Präferenzen der Gattungen *Vipera*, *Montivipera* und *Macrovipera* beispielhaft studieren. Die Kenntnis über die Chorologie rezenter kleinasiatischer Viperiden gewährleistet Rückschlüsse auf die Paläobiogeographie eurasischer Vipern.

In Kleinasien bewohnen Arten beider Komplexe unterschiedliche ökologische Nischen. *Vipera ammodytes* ist auf die feucht-warmen Regionen entlang der Schwarzmeerküste beschränkt (Nilson et al. 1988). Alle Nachweise aus der türkischen Ägäis, der Südtürkei oder Syrien sind fabulös und wurden nach ihrer Beschreibung nicht mehr bestätigt. *Montivipera* bewohnt die mediterranen Gebirgsregionen von der Ägäis bis nach Ostanatolien (Nilson et al. 1988). *Macrovipera* hingegen ist ein Bewohner baumarmer Biotope mit kontinentalen Steppenklimate (Nilson et al. 1988). Alle Arten der genannten Gattungen sind in ihrem ökologischen Verhalten eher konservativ. Bergottern (*Montivipera*) sind nicht bis zum Schwarzen-See vorgedrungen und *Vipera ammodytes* konnte nicht die südtürkische Mittelmeerküste erobern. Das Areal der Levanteotter (*Macrovipera*) zeigt

Anzeichen für historische Expansion und Kontraktion. Auch ihr war es nicht möglich, sich neuen ökologischen und klimatischen Bedingungen anzupassen. Sie sind „Gefangene“ ihrer ökologischen Nische.

Die Kombination aus fehlenden reproduktiven Barrieren und der Annahme, Arten behalten im Laufe der Evolution ihre ökologische Präferenz („Niche-conservatism“) bei, lassen sich biogeographische Szenarien rekonstruieren und Fossilüberlieferungen validieren.

Szyndlar & Rage (1999) schreiben zur Verbreitung orientalischer Vipern und den Arten des „*aspis*-Komplexes“: Sie seien im späten Miozän und Pliozän in Europa weit verbreitet gewesen.

Die mitteleuropäischen Fossilfunde des „*aspis*-Komplexes“ und der orientalischen Vipern sind wegen unterschiedlicher ökologischer Präferenzen nicht im Sinne syntop verbreiteter Arten aufzufassen. Sie gehören möglicherweise unterschiedlichen Zeithorizonten innerhalb der Säugerzonen an und bezeugen historische Arealexpansionen und -kontraktionen. Darüber hinaus handelt es sich bei den Arten wahrscheinlich um ausgestorbene Linien (Szyndlar & Rage 1999), die andere ökologische Präferenzen aufwiesen als ihre heutigen Verwandten. In diesem Zusammenhang sind die fossilen Arten des „*Vipera aspis*-Komplexes“ bemerkenswert, die in einem der wärmsten Zeitabschnitte des Neogen, dem Langhium, das subtropische Mitteleuropa bewohnten.

Die Verbreitung rezenter europäischer Viperinae ist an spezifische klimatische Bedingungen geknüpft. So unterliegt der Fortpflanzungszyklus eurasischer Viperiden endogenen Rhythmen, die durch äußere Faktoren (Klima) gesteuert werden. Männliche und weibliche Geschlechtszellen sind nicht permanent, sondern nur in einem schmalen Zeitfenster in reifem Zustand verfügbar (Saint Girons 1976). Die Reifung der Geschlechtszellen ist bei Viperiden gemäßigter und mediterraner Breiten stark an eine Temperaturabsenkung in der Winterruhe gebunden, die obligatorisch für die Bildung der Geschlechtszellen und für die Einleitung der Fortpflanzungsbereitschaft ist.

➤ Zweifelhaft ist auch die korrekte taxonomisch und systematische Identifizierung der morphologisch sehr ähnlichen Wirbelkörper. Die meisten Fossilbeschreibungen basieren auf einzelnen, häufig beschädigten Wirbelkörpern. Szyndlar & Rage (1999) stellen fest, dass Beziehungen zwischen ausgestorbenen und rezenten Taxa unklar sind, wenngleich sie fossile Vipern nach ihrer Ähnlichkeit den vier rezenten Großgruppen *ammodytes*, *aspis*, *Macrovipera*, *Montivipera* und *Daboia* zuordnen.

Szyndlar & Rage (1999) haben in ihrer Untersuchung keine ontogenetischen Veränderungen des Skelettes untersucht, bemerken aber, dass die Körpergröße einer Art morphologische Proportionen und damit auch die Identifizierung beeinflussen kann:

„Vertebrae of *V. ammodytes* are larger and morphologically very similar to those of smaller individuals of the ‚Oriental Vipers‘, whereas vertebrae of *V. aspis* and *V. latastei* are smaller and morphologically closer to those of the ‘*V. berus* complex’” (Szyndlar & Rage 1999, S. 12).

Es erscheint also durchaus denkbar, dass verschiedene Wirbel-Ontogenesestadien derselben Art, wenn sie dazu noch beschädigt sind, unterschiedlichen Arten zugerechnet werden.

## 10 Literaturverzeichnis

- Agustí, J., Cabrera, L., Garcés, M., Krijgsman, W., Oms, O., J.M. Peres (2001): A calibrated mammal scale for the Neogene of Western Europe. – State of the art. – Earth-Sci. Rev. 52: 247-260.
- Agustí, J., M. Garcés, W. Krijgsman (2006): Evidence for African-Iberian exchanges during the Messinian in the Spanish mammalian record. – Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 238: 5-14.
- Albert, E.M., San Mauro, D., García-París, M., Rüber, L., R. Zardoya (2009): Effect of taxon sampling on recovering the phylogeny of squamate reptiles based on complete mitochondrial genome and nuclear gene sequence data. – Gene, 441: 12-21.
- Ali, J.R., J.C. Aitchison (2008): Gondwana to Asia: Plate tectonics, paleogeography and the biological connectivity of the Indian sub-continent from the Middle Jurassic through latest Eocene (166-35 Ma). – Earth-Science Reviews 88: 145-166.
- Allawi H.T., J., Jr SantaLucia (1997): Thermodynamics and NMR of Internal GâT Mismatches in DNA. – Biochemistry 36: 10581-10594.
- Al-Oran, R.M., Rostum, S., Joger, U., Z. Amr (1998): First record of the Levantine Viper, *Macrovipera lebetina*, from Jordan. – Zoology in the Middle East 16: 65-70.
- Alroy J., Koch, P.L., J.C. Zachos (2000): Global climate change and North American mammalian evolution. – Paleobiology 26: 259-88.
- Álvarez, C., J.A. Mateo, J. Oliver, J. Mayol (2010): Los ofidios ibéricos de introducción reciente en las Islas Baleares. – Bol. Asoc. Herpetol. Esp. 21: 126-131.
- Alcover, J.A., Sans, A., M. Palmer (1998): The extent of extinction of mammals on islands. – Journal of Biogeography 25: 913-918.
- Amer, S.A.M., Y. Kumazawa (2005): Mitochondrial DNA sequences of the Afro-Arabian spiny-tailed lizards (genus *Uromastix*; family Agamidae): phylogenetic analyses and evolution of gene arrangements. – Biol. J. Linn. Soc. 8: 247-260.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Standen, R., I.G. Yong (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. – Nature, 290: 457-465.
- Antoine, P.O., Welcomme, J.L., Marivaux, L., Baloch, I., Benammi, M., P. Tassy (2003): First record of Paleogene Elephantoidea (Mammalia, Proboscidea) from the Bughti Hills of Pakistan. – J. Vertebr. Paleontol. 23: 977-980.
- Antonelli, A., Nylander, J.A.A., Persson, C., I. Sanmartín (2009): Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. – PNAS 106: 9749-9754.
- Antunes, A., Templeton, A.R., Guyomard, R., P. Alexandrino (2002): The role of nuclear genes in intraspecific evolutionary inference: genealogy of the transferrin gene in the Brown Trout. – Mol. Biol. Evol. 19: 1272-1287.
- Antunes, M.T., J.C. Rage (1974): Notes sur la géologie et la paléontologie du Miocène de Lisbonne. XIV – Quelques Squamata (Reptilia). – Bol. Soc. Geol. Port. 19: 47-60.
- Apesteguía, S., H. Zaher (2006): A Cretaceous terrestrial snake with robust hindlimbs and a sacrum. – Nature 440: 1037-1040.



- Aris-Brosou, S., Z. Yang (2002): Effects of models of rate evolution on estimation of divergence dates with special reference to the metazoan 18s ribosomal RNA phylogeny. – *Syst. Biol.* 51: 703-714.
- Aris-Brosou, S., Z. Yang (2003): Bayesian models of episodic evolution support a late Precambrian explosive diversification of the Metazoa. – *Mol. Biol. Evol.* 20: 1947-1954.
- Ashe, J.S., H. Marx (1988): Phylogeny of the Viperinae snakes (Viperinae): Part II. Cladistic analysis and major lineages. – *Field. Zool.*, 52: 1-23.
- Avise, J.C. (1986): Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. – *Phil. Trans. R. Soc. London B* 312: 325-342.
- Avise, J.C. (2000): *Phylogeography. The history and formation of species.* – Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Avise, J.C. (2004): *Molecular markers, natural history, and evolution.* – Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Avise, J.C. (2007): Twenty-five key evolutionary insights from the phylogeographic revolution in population genetics. In: S. Weiss & N. Ferrand [eds.], *Phylogeography of Southern European Refugia*, Springer Dordrecht, pp. 7-21.
- Avise, J.C. (2009): Phylogeography: retrospect and prospect. – *Journal of Biogeography* 36: 3-15.
- Avise, J.C., R.M., Jr Ball (1990): Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. – *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 7: 45-67.
- Avise, J.C., T.J. Robinson (2008): Hemiplasy: A new term in the lexicon of phylogenetics. – *Syst. Biol.* 57: 503-507.
- Avise, J.C., K. Wollenberg (1997): Phylogenetics and the origin of species. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7748-7755.
- Avise, J.C., Lansman, R.A., R.O. Shade (1979): The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. – *Genetics* 92: 279-295.
- Avise, J.C., Walker, D., G.C. Johns (1998): Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. – *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 1707-1712.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, Jr, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., N.C. Saunders (1987): Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Ayala, F.J. (1997): Vagaries of the molecular clock. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7776-7783.
- Ayala, F.J. (1999): Molecular clock mirages. – *Bioessays* 21: 71-75.
- Badgley, C., Barry, J.C., Morgan, M.E., Nelson, S.V., Behrensmeyer, A.K., Cerling, T.E., D. Pilbeam (2008): Ecological changes in Miocene mammalian record show impact of prolonged climatic forcing. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 12145-49.
- Badgley, C., Nelson, S., Barry, J.C., Behrensmeyer, A.K., T. Cerling (2005): Testing models of faunal turnover with Neogene mammals from Pakistan. In: Lieberman D.E., Smith, R.J., J. Kelley [eds.], *Interpreting the Past: Essays on Human, Primate, and Mammal Evolution in Honor of David Pilbeam*, Boston, MA: Brill Acad., pp. 29-62.
- Ballard, J.W.O., D.M. Rand (2005): The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. – *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 36: 621-642.

- Barbanera, F., Zuffi, M.A.L., Guerrini, M., Gentili, A., Tofanelli, S., Fasola, M., F. Dini (2009): Molecular phylogeography of the asp viper *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758) in Italy: Evidence for introgressive hybridization and mitochondrial DNA capture. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 103-114.
- Barker, N.P., Weston, P.H., Rutschmann, F., H. Sauquet (2007): Molecular dating of the 'Gondwanan' plant family Proteaceae is only partially congruent with the timing of the break-up of Gondwana. – *Journal of Biogeography* 34: 2012-27.
- Barracough, T.G., S. Nee (2001): Phylogenetics and speciation. – *Trends in Ecology and Evolution* 16: 391-99.
- Bar-Yosef, O., A. Belfer-Cohen (2001): From Africa to Eurasia – early dispersals. – *Quaternary International* 75: 19-28.
- Bar-Yosef, O., M. Belmaker (2010): Early and middle Pleistocene faunal and hominins dispersals through southwestern Asia. – *Quaternary Science Reviews* 29. (doi/10.1016/j.quascirev.2010.02.016)
- Battistuzzi, F.U., Filipski, A., Hedges, S.B., S. Kumar (2010): Performance of relaxed-clock methods in estimating evolutionary divergence times and their credibility intervals. – *Mol. Biol. Evol.* 27: 1289-1300.
- Bauchot, R. (1998): Schlangen: Evolution, Anatomie, Physiologie, Ökologie und Verbreitung, Verhalten, Bedrohung und Gefährdung, Haltung und Pflege. – Bechermünz Verlag.
- Beard, K.C. (2002): East of Eden at the Paleocene/Eocene boundary. – *Science* 295: 2028-2029.
- Beiko, R.G., N. Hamilton (2006): Phylogenetic identification of lateral gene transfer events. – *BMC Evol. Biol.* 6: 15.
- Bell, C.D., M.J. Donoghue (2005): Dating the Dipsacales: Comparing models, genes, and evolutionary implications. – *Am. J. Bot.* 92: 284-296.
- Bellairs, A.D., U. Underwood (1951): The origin of snakes. – *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 26: 193-237.
- Benton, M.J., F.J. Ayala (2003): Dating the tree of life. – *Science* 300: 1698-1700.
- Benton, M.J., P.C.J. Donoghue (2007): Paleontological evidence to date the tree of life. – *Mol. Biol. Evol.* 24: 26-53.
- Berggren, W.A., Kent, D.V., J.A. van Couvering (1985): The Neogene: Part 2 Neogene geochronology and chronostratigraphy. – Geological Society, London, *Memoirs* 10: 211-260.
- Bhagwat, S.A., K.J. Willis (2008): Species persistence in northerly glacial refugia of Europe: a matter of chance or biogeographical traits? – *Journal of Biogeography* 35: 464-482.
- Billing, H., B. Schätti (1984): Vorläufige Mitteilungen zum Subspezies-Problem bei *Vipera lebetina* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae). – *Salamandra*, Bonn 20: 65-69.
- Blair, J.E., S.B. Hedges (2005): Molecular clocks do not support the Cambrian explosion. – *Mol. Biol. Evol.* 22: 387-390.
- Blanc, P.-L. (2002): The opening of the Plio-Quaternary Gibraltar Strait: assessing the size of a cataclysm. – *Geodin. Acta* 15: 303-317.
- Blanquart, S., N. Lartillot (2006): A Bayesian compound stochastic process for modelling non-stationary and non-homogeneous sequence evolution. – *Mol. Biol. Evol.* 23: 2058-2071.

- Boekhorst, J., B. Snel (2007): Identification of homologs in insignificant blast hits by exploiting extrinsic gene properties. – BMC Bioinformatics 8: 356. (doi: 10.1186/1471-2105-8-356)
- Böhme, M. (2003): The Miocene climatic optimum: evidence from ectothermic vertebrates of Central Europe. – Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 195: 389-401.
- Böhme, M.U., Fritzsch, G., Tippmann, A., Schlegel, M., T.U. Berendonk (2007): The complete mitochondrial genome of the green lizard *Lacerta viridis viridis* (Reptilia: Lacertidae) and its phylogenetic position within squamate reptiles. – Gene 394: 69-77.
- Böhme, W. (1978): Das Kühnelt'sche Prinzip der regionalen Stenozie und seine Bedeutung für das Subspezies-Problem: ein theoretischer Ansatz. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 16: 256-266.
- Böhme, W. (1987): Nachweis von *Vipera lebetina* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae) an der zentralen Südküste der Türkei. – Salamandra, Bonn 23: 173-175.
- Böhme, W. (1993): *Coluber gyarusensis* Mertens, 1968 – Gyaros-Pfeilnatter. In: Böhme, W. [ed.], Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III, AULA-Verlag, Wiesbaden, pp. 111-114.
- Böhme, W., U. Joger (1983): Eine neue Art des *Vipera berus*-Komplexes aus der Türkei. – Amphibia Reptilia 4: 265-271.
- Boore, J.L. (1999): Animal mitochondrial genomes. – Nucleic Acids Res. 27: 1767-1780.
- Boore, J.L., Lavrov, D.V., W.M. Brown (1998): Gene translocation links insects and crustaceans. – Nature, 392: 667-668.
- Boore, J.L., Macey, J.R., M. Medina (2005): Sequencing and comparing whole mitochondrial genomes of animals. – Methods in Enzymology 395: 311-348.
- Boore, J.L., Medina, M., L.A. Rosenberg (2004): Complete sequences of the highly rearranged molluscan mitochondrial genomes of the scaphopod *Graptacme eborea* and the bivalve *Mytilus edulis*. – Mol. Biol. Evol. 21: 1492-1503.
- Boore, J.L., Collins, T.M., Stanton, D., Daehler, L.L., W.M. Brown (1995): Deducing arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. – Nature, 376: 163-165.
- Bostanchi, H., Anderson, S.C., Kami, H.G., T.J. Papenfuss (2006): A new species of *Pseudocerastes* with elaborate tail ornamentation from western Iran (Squamata: Viperidae). Proc. Calif. Acad. Sci. 57: 443-450.
- Bottema, S., W. van Zeist (1981): Palynological evidence for the climatic history of the Near East, 50,000-6000 BP. In: Cauvin J., Sanlville P. [eds], Préhistoire du Levant. Colloques Internationale CNRS, N. 593. Paris. pp. 111-132.
- Bowen, G.J., Clyde, W.C., Koch, P.L., Ting, S., Alroy, J., Tsubamoto, T., Y. Wang (2002): Mammalian dispersal at the Paleocene/Eocene boundary. – Science 295: 2062-2065.
- Bowers, J.E., Chapman B.A., Rong J., A.H. Paterson (2003): Unraveling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. – Nature 422: 433-438. (doi: 10.1038/nature01521)
- Bradshaw, A.D. (1991): Genostasis and the limits to evolution. – Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B 333: 289-305.

- Bridge, D., Clifford W. Cunningham, B. Schierwater, R. Desalle, L.W. Buss (1992): Class-level relationships in the phylum Cnidaria: Evidence from mitochondrial genome structure (Anthozoa/Hydrozoa/phylogeny/Scyphozoa). – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8750-8753.
- Briggs, J.C. (2003): The biogeographic and tectonic history of India. – J. Biogeogr. 30: 381-388.
- Brinkmann, H., van der Giezen, M., Zhou, Y., de Raucourt, G.P., H. Philippe (2005): An empirical assessment of long-branch attraction artefacts in deep eukaryotic phylogenomics. – Syst. Biol. 54: 743-757.
- Brito, J.C. Santos, X., Pleguezuelos, J.M., N. Sillero (2008): Inferring evolutionary scenarios with geostatistics and geographical information systems for the viperid snakes *Vipera latastei* and *Vipera monticola*. – Biological Journal of the Linnean Society 95: 790-806.
- Brito, J.C., Santos, X., Pleguezuelos, J.M., Fahd, S., Llorente, G.A., X. Parellada (2006): Morphological variability of the Lataste's viper (*Vipera latastei*) and the Atlas dwarf viper (*Vipera monticola*): patterns of biogeographical distribution and taxonomy. – Amphibia-Reptilia 27: 219-240.
- Brito, P., S. Edwards (2009): Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. – Genetica 135: 439-455. (doi: 10.1007/s10709-008-9293-3)
- Britten, R.J. (1986): Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. – Science 231: 1393-1398.
- Brodmann, P. (1987): Die Giftschlangen Europas und die Gattung *Vipera* in Afrika und Asien. – Basel, Kümmerly+Frey, pp. 148.
- Bromham, L., D. Penny (2003): The modern molecular clock. – Nat. Rev. Genet. 4: 216-224.
- Bromham, L., Philipps, M.J., D. Penny (1999): Growing up with dinosaurs: molecular dates and the mammalian radiation. – Trends Ecol. Evol. 14: 113-118.
- Brooks, D.R., D.A. McLennan (1991): Phylogeny, ecology, and behavior. – Chicago: Univ. Chicago Press.
- Brooks, D.R., van Veller, M.G.P., D.A. McLennan (2001): How to do BPA, really. – Journal of Biogeography 28: 345-358.
- Brown, J.H., M.V. Lomolino (1998): Biogeography. 2d ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Brown, J.W., Rest J.S., Garcia-Moreno J., Sorenson M.D., D.P. Mindell (2008): Strong mitochondrial DNA support for a cretaceous origin of modern avian lineages. – BMC Biol. 6: 6.
- Brown, R., Z. Yang (2010): Bayesian dating of shallow phylogenies with a relaxed clock. – Syst. Biol. 59: 119-131.
- Brown, W.M. (1985): The mitochondrial genome of animals. In: R.J. Macintyre [ed.] Molecular Evolutionary Genetics pp. 95-130. New York: Plenum.
- Brown, W.M., George Jr, M., A.C. Wilson (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1967-71.
- Bruno, S. (1985): Le vipere d'Italia e d'Europa. – Edagricole, Bologna.
- Buckley, T.R. (2002): Model misspecification and probabilistic tests of topology: Evidence from empirical data sets. – Syst. Biol. 51: 509-523. (doi: 10.1080/10635150290069922)
- Buckley, T.R., C.W. Cunningham (2002): The effects of nucleotide substitution model assumptions on estimates of nonparametric bootstrap support. – Mol. Biol. Evol. 19: 394-405.

- Buckley, T.R., Simon, C., Shimodaira, H., G.K. Chambers (2001): Evaluating hypotheses on the origin and evolution of the New Zealand alpine cicadas (Maoricicada) using multiple comparison tests of tree topology. – Mol. Biol. Evol. 18: 223-234.
- Burnham, K.P., D.R. Anderson (2003): Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Cadle, J.E. (1988): Phylogenetic relationships among advanced snakes: a molecular perspective. – University of California Publications in Zoology 119: 1-70.
- Cadle, J.E. (1992): Phylogenetic relationships among vipers: immunological evidence. In: Campbell, J.A., Brodie, Jr. E.D. [eds.], Biology of the Pitvipers, Selva, Tyler, Texas, pp. 41-48.
- Caldwell, M.W., M.S.Y. Lee (1997): A snake with legs from the marine Cretaceous of the Middle East. – Nature 386: 705-709.
- Cameron, S.L., Miller, K.B., D' Haese, C.A., Whiting, M.F., S.C. Barker (2004): Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationships of Entognatha, Insecta and Crustacea sensu lato (Athropoda). – Cladistics, 20: 534-557.
- Campell, J.A., W.W. Lamar (1993): The venomous Reptiles of Latin America. – Cornell University Press, pp. 425, New York.
- Capella-Gutierrez, S., Silla-Martinez, J.M., T. Gabaldon (2009): trimAl: a tool for automated alignment trimming in largescale phylogenetic analyses. – Bioinformatics 25: 1972-1973.
- Carnaval, A., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T., C. Moritz (2009): Stability predicts genetic diversity in the Brazilian atlantic forest hotspot. – Science 323: 785-789.
- Carranza, S., E.N. Arnold, J.M. Pleguezuelos (2006): Phylogeny, biogeography, and evolution of two Mediterranean snakes, *Malpolon monspessulanus* and *Hemorrhois hippocrepis* (Squamata, Colubridae), using mtDNA sequences. – Molecular Phylogenetics and Evolution 40: 532-546.
- Castoe, T.A., Jiang, Z.J., Gu, W., Wang, Z.O., D.D. Pollock (2008): Adaptive evolution and functional redesign of core metabolic proteins in snakes. – PLoS ONE, 3:e2201.
- Castoe, T.A., de Koning, A.P.J., Kim, H.-M., Gu, W., Noonan, B.P., Naylor, G., Jiang, Z.J., Parkinson, C.L., D.D. Pollock (2009): Evidence for an ancient adaptive episode of convergent molecular evolution. – PNAS, 10: 1073-1079
- Chatterjee, S., C.R. Scotese (1999): The breakup of Gondwana and the evolution and biogeography of the Indian plate. – Proc. Indian Nat. Sci Acad. 65A: 397-425.
- Chikin, Y.A., N.N. Szczerbak (1992): *Vipera lebetina Černovi*, sp. n. (Reptilia, Viperidae) a new subspecies from Central Asia. – Vestnik Zoology 6: 45-49.
- Chippaux, J.-P. (1998): Snake-bites: appraisal of a global situation. – Bull. World Health Organization 76: 515-524.
- Chippaux, J.-P. (2008): Estimating the global burden of snakebite can help to improve management. – PLoS Med 5: e221. (doi: 10.1371/journal.pmed.0050221)
- Chkhikvadze, V.M. (1985): Preliminary results of the study of Tertiary amphibians and squamate reptiles of the Zaisan Basin. In: Voprosy Gerpetologii. 6th all-Union Herpetological Conference. Tashkent, 18-20 September 1985, Abstracts: 234-235.
- Conti, E., Eriksson, T., Schonenberger, J., Sytsma, K.J., D.A. Baum (2002): Early Tertiary out-of-India dispersal of Crypteroniaceae: Evidence from phylogeny and molecular dating. – Evolution 56: 1931-1942.

- Conti, E., Rutschmann, F., Eriksson, T., Sytsma, K.J., D.A. Baum (2004): Calibration of molecular clocks and the biogeographic history of Crypteroniaceae: A reply to Moyle. – *Evolution* 58: 1874-1876.
- Cook, C.E., Yue, Q., M. Akam (2005): Mitochondrial genomes suggest that hexapods and crustaceans are mutually paraphyletic. – *Proc. R. Soc. London, B* 272: 1295-1304.
- Cordova, C.E., Harrison, S.P., Mudie, P.J., Riehl, S., Leroy, S.A.G., N. Ortiz (2009): Pollen, plant macrofossil and charcoal records for palaeovegetation reconstruction in the Mediterranean-Black Sea Corridor since the Last Glacial Maximum. – *Quaternary International* 197: 12-26.
- Cox, C.B., P.D. Moore (2005): *Biogeography: An ecological and evolutionary approach*. Oxford, UK.: Blackwell.
- Cox, N., Chanson, J., S. Stuart (2009): the Status and distribution of Reptiles and Amphibians of the Mediterranean Basin. – IUCN red list of threatened species, mediterranean regional assessment No. 2., SSC.
- Creer, S., Malhotra, A., Thorpe, R.S., Stocklin, R., Favreau, P., W.-H. Chou (2003): Genetic and ecological correlates of intraspecific variation in pitviper venom composition detected using matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and isoelectric focusing. – *J. Mol. Evol.*, 56: 317-329.
- Creevey, C.J., Fitzpatrick, D.A., Philip, G.K., Kinsella, R.J., O'Connell, M.J., Pentony, M.M., Travers, S.A., Wilkinson, M., J.O. McInerney (2004): Does a tree-like phylogeny only exist at the tips in the prokaryotes? – *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 271: 2551-2558.
- Crisci, J.V. (2001): The voice of historical biogeography. – *Journal of Biogeography* 28: 157-168.
- Cuny, G., Jaeger J.J., Mahboubi M., J.C. Rage (1990): Les plus anciens serpents (Reptilia, Squamata) connus. Mise au point sur l'âge géologique des serpents de la partie moyenne du Crétacé. – *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences, Paris, II*, t. 311, pp. 1267-1272.
- Curat, M., Ray, N., L. Excoffier (2004): SPLATCHE: A program to simulate genetic diversity taking into account environmental heterogeneity. – *Mol. Ecol. Notes* 4: 139-142.
- Cutler, D.J. (2000): Estimating divergence times in the presence of an overdispersed molecular clock. – *Mol. Biol. Evol.* 17: 1647-1660.
- Darlington, P.J. (1957): *Zoogeography: The Geographical Distribution of Animals*, New York: John Wiley and Sons.
- Darlington, Jr, P.J. (1965): *Biogeography of the southern end of the world*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- David, P., I. Ineich (1999): Les serpents venimeux du monde: systématique et repartition. – *Dumerilia* 3: 3-499.
- Davis, S.J.M. (2003): The zoo-archaeology of Khirokitia (Neolithic Cyprus), including a view from the mainland. – *Bulletin de correspondance Hellénique* 43: 253-268.
- de Queiroz, A. (2005): The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. – *Trends in Ecology and Evolution* 20: 68-73.
- De Smedt, J. (2001): *Die europäischen Vipern, Systematik, Haltung und Zucht*. – Kempten, Kösel GmbH & Co KG, pp. 206.

- Dely, O., U. Joger (2005): *Vipera (Pelias) ursinii* Bonaparte, 1835 – Wiesenotter. In: Joger, U., N. Stümpel [eds.], Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III, AULA-Verlag, Wiesbaden, pp. 375-414.
- Dercourt, J., Gaetani, M., Vrielynck, B., Barrier, E., Biju-Duval, B., Brunet, M.F., Cadet, J.P., Crasquin, S., M. Sandulescu [eds.] (2000): Atlas Peri-Tethys, Palaeogeographical Maps. CCGM/CGMW, Paris.
- Dermitzakis, M.D., D.J. Papanikolaou (1981): Paleogeography and geodynamics of the Aegean region during the Neogene. – *Annales Geologiques des Pays Hellenic* 30: 245-289.
- Dermitzakis, M.D., P.Y. Sondaar (1978): The importance of fossil mammals in reconstructing paleogeography with special reference to the pleistocene Aegean Archipelago. – *Annales Géologiques des Pays Helléniques* 29: 808-840.
- DeSalle, R., Wheeler, W., G. Gonzalo (2002): Techniques in molecular systematics and evolution, Birkhäuser, pp. 450.
- Djamali, M., de Beaulieu, J.-L., Shah-hosseini, M., Andrieu-Ponel, V., Ponel, P., Amini, A., Akhiani, H., Leroy, S.A.G., Stevens, L., Lahijani, H., S. Brewer (2008): A late Pleistocene long pollen record from Lake Urmia, NW Iran. – *Quaternary Research* 69: 413-420.
- Dolman, G., B. Phillips (2004): Single copy nuclear DNA markers characterized for comparative phylogeography in Australian wet tropics rainforest skinks. – *Mol. Ecol. Notes* 4: 185-187.
- Dong, S., Y. Kumazawa (2005): Complete mitochondrial DNA sequences of six snakes: phylogenetic relationships and molecular evolution of genomic features. – *J. Mol. Evol.*, 61: 12-22.
- Donoghue, P.C., M.J. Benton (2007): Rocks and clocks: calibrating the tree of life using fossils and molecules. – *Trends Ecol. Evol.* 22: 424-431.
- Doronichev, V.B. (2008): The lower Paleolithic in eastern Europe and the Caucasus: A reappraisal of the data and new approaches. – *Paleo Anthropology* 2008: 107-157.
- Douglas, D.A., D.J. Gower (2010): Snake mitochondrial genomes: phylogenetic relationships and implications of extended taxon sampling for interpretations of mitogenomic evolution. – *BMC Genomics* 11: 14. (doi:10.1186/1471-2164-11-14)
- Douglas, D.A., Jahnke, A., U. Jarnason (2006): A mitogenomic study on the phylogenetic position of snakes. – *Zoologica Scripta*, 35: 545-558.
- Dowsett, H.J., R.Z. Poore (1991): Pliocene sea surface temperatures of the North Atlantic Ocean at 3.0 Ma. – *Quat. Sci. Rev.* 10: 189-204. (doi: 10.1016/0277-3791(91)90018-P)
- Drummond, A.J., A. Rambaut (2007): BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. – *BMC Evol. Biol.* 7: 214.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips M.J., A. Rambaut (2006): Relaxed phylogenetics and dating with confidence. – *PLoS Biol.* 4: 699-710.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., O.G. Pybus (2005): Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. – *Mol. Biol. Evol.* 22: 1185-1192.
- Dupont-Nivet, G., Krijgsman, W., Langereis, C.G., Abels, H.A., Dai, S., X. Fang (2007): Tibetan plateau aridification linked to global cooling at the Eocene-Oligocene transition. – *Nature* 445: 635-638.
- Egan, A.E., J. Doyle (2010): A comparison of global, gene-specific, and relaxed clock methods in a comparative genomics framework: dating the polyploid history of Soybean (*Glycine max*). – *Syst. Biol.* 59: 1-14.

- Eiselt, J., I. Baran (1970): Ergebnisse zoologischer Sammelreisen in der Türkei: Viperidae. – Annalen des Naturhistorischen Museum Wien 74: 357-369.
- Entzeroth, A. (1989): Ein weiteres Belegexemplar von *Vipera lebetina* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae) von der zentralen Südküste der Türkei. – Salamandra, Bonn 25: 59-61.
- Enzel, Y., Arnit, R., Dayan, U., Crouvi, O., Kahana, R., Ziv, B., D. Sharon (2008): The climatic and physiographic controls of the eastern Mediterranean over the late Pleistocene climates in the southern Levant and its neighboring deserts. – Global and Planetary Change 60: 165-192.
- Erixon, P., B. Svennblad, T. Britton, B. Oxelman (2003): Reliability of Bayesian posterior probabilities and bootstrap frequencies in phylogenetics. – Syst. Biol. 52: 665-673.
- Eronen, J.T., L. Rook (2004): The Mio-Pliocene European primate fossil record: dynamics and habitat tracking. – J. Hum. Evol. 47: 323-41.
- Escoriza, D., Comas, M.M., Donaire, D., S. Carranza (2006): Rediscovery of *Salamandra algira* Bedriaga, 1833 from the Beni Snassen massif (Morocco) and phylogenetic relationships of North African *Salamandra*. – Amphibia-Reptilia 27: 448-455.
- Estes, R., De Queiroz, K., J. Gauthier (1988): Phylogenetic relationships within Squamata. In: Estes, R. & G. Pregill [eds]. – Phylogenetic relationships of the lizard families. Stanford University Press, Stanford, Calif., pp. 119-128.
- Evans, S.E. (2003): At the feet of the dinosaurs: the early history and radiation of lizards. – Biol. Rev. 78: 513-551.
- Ewens, W.J. (1979): Mathematical population genetics. – Springer-Verlag, Berlin.
- Excoffier, L., S. Schneider (1999): Why hunter-gatherer populations do not show signs of Pleistocene demographic expansions. – Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 96: 10597-10602.
- Excoffier, L., Smouse P.E., J.M. Quattro (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA restriction data. – Genetics 131: 479-491.
- Faccenna, C., Bellier, O., Martinod, J., Piromallo, C., V. Regard (2006): Slab detachment beneath eastern Anatolia: A possible cause for the formation of the North Anatolian fault . – Earth and Planetary Science Letters 242: 85-97.
- Fagundes, N.J.R., Ray, N., Beaumont, M., Neuenschwander, S., Salzano, F.M., Bonatto, S.L., L. Excoffier (2007): Statistical evaluation of alternative models of human evolution. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 17614-17619.
- Fatehi-Hassanabad, Z., M. Fatehi (2004): Charakterisation of some pharmacological effects of the venom from *Vipera lebetina*. – Toxicon 43: 385-391.
- Felsenstein, J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. – J. Mol. Evol. 17: 368-376.
- Fernandez-Silva, P., Enriquez, J.A., I. Montoya (2003): Replication and transcription of mammalia mitochondrial DNA. – Exp Physiol, 88: 41-56.
- Finkel, T., N.J. Holbrook (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. – Nature 408: 239-47.
- Fitch, W.M., E. Markowitz (1970): An improved method for determining codon variability in a gene and its application to the rate of fixation of mutations in evolution. – Biochem. Genet. 4: 579-593.



- Fortelius, M., Eronen, J., Liu, L., Pushkina, D., Tesakov, A., Vislobokova, I., Z. Zhang (2006): Late Miocene and Pliocene large land mammals and climatic changes in Eurasia. – *Palaeogeogr. Palaeoclim. Palaeoecol.* 238: 219-27.
- Franzen, M., H. Sigg (1989): Bemerkungen zu einigen Schlangen Ostanatoliens. – *Salamandra* 25: 203-212.
- Franzen, M., Bussmann, M., Kordes, K., B. Thiesmeier (2008): Die Amphibien und Reptilien der Südwest-Türkei. – Laurenti-Verlag, pp. 328.
- Fry, B.G., Vidal, N., Norman, J.A., Vonk, F.J., Scheib, H., Ramjan, S.F.R., Kuruppu, S., Fung, K., Hedges, S.B., Richardson, M.K., Hodgson, W.C., Ignjatovic, V., Summerhayes, R., E. Kochva (2006): Early evolution of the venom system in lizards and snakes. – *Nature*, 439: 584-588.
- Fu, X.Y. (1997): Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. – *Genetics* 147: 915-925.
- Fujita, M.K., Engstrom, T.N., Starkey, D.E., H.B. Shaffer (2004): Turtle phylogeny: Insights from a novel nuclear intron. – *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 1031-1040.
- Funk, D.J., K.E. Omland (2003): Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. – *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34: 397-423. (doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421)
- Futuyma, D.J. (1998). *Evolutionary biology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., G.D.D. Hurst: (2009): Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. – *Molecular Ecology* 18: 4541-4550
- Gandolfo, M.A., Nixon K.C., W.L. Crepet (2008): Selection of fossils for calibration of molecular dating models. – *Ann. Missouri Bot. Gard.* 95: 34- 42.
- Garanin, Pavlov, Bakiev (2004): Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Литвинов Н.А., Павлов А.В., Ратников В.Ю. 2004. Змеи Волжско-Камского края. Самара: Изд-во Самар. науч. центра РАН. 192 с
- Garcia-Vallve, S., Guzman E., Montero M.A., A. Romeu (2003): HGT-DB: a database of putative horizontally transferred genes in prokaryotic complete genomes. – *Nucleic Acids Res.* 31: 187-189.
- Gardner J.D., R.L. Cifelli (1999): A primitive snake from the Cretaceous of Utah. – *Sp. Pap. Palaeont.* 60: 87-100.
- Garfunkel, Z. (1998): Constraints on the origin and history of the Eastern Mediterranean basin. – *Tectonophysics* 298: 5-35.
- Garrigues, T., Daugab, C., Ferquelc, E., Choumetd, V., A.-B. Failloux (2005): Molecular phylogeny of *Vipera* Laurenti, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 35-47
- Gaut, B.S., P.O. Lewis (1995): Success of maximum likelihood in the four-taxon case. – *Mol. Biol. Evol.* 12: 152-162.
- Geraga, M., Tsaila-Monopolis, St., Ioakim, Chr., Papatheodorou, G., G. Ferentinos (2000): Evaluation of palaeoenvironmental changes during the last 18, 000 years in the Myrtoon basin, SW Aegean Sea. – *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 156: 1-17
- Gheerbrant, E. (1987): Les Vertébrés continentaux de l'Adrar Mgorn (Maroc, Paléocène); une dispersion de mammifères transéthysienne aux environs de la limite Mésozoïque/Cénozoïque? – *Geodin. Acta* 1: 233-245.

- Gheerbrant, E. (1990): On the early biogeographical history of the African placentals. – *Hist. Biol.* 4: 107-116.
- Gheerbrant, E. (2001): Histoire paléobiogéographique des mammifères paléogènes du domaine arabo-africain. – H.D.R. thesis, Univ. Paris VI.
- Gheerbrant, E., J. -C. Rage (2006): Paleobiogeography of Africa: How distinct from Gondwana and Laurasia? – *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 241: 224-246.
- Ghira, I. (1992): External morphology of some isolated populations of *Vipera ammodytes ammodytes* (Linnaeus, 1758) at the northern limit of its areal. – *Proc. Sixth Ord. Gen. Meet. S.E.H., Budapest 1991*: 183-186.
- Gillham, N.W. (1978): Organelle heredity. – New York: Raven, 650 pp.
- Glover, C., A. Robertson (1998): Neotectonic intersection of the Aegean and Cyprus tectonic arcs: extensional and strike-slip faulting in the Isparta Angle, SW Turkey. – *Tectonophysics* 298: 103-132.
- Göçmen, B., W. Böhme (2002): New evidence for the occurrence of the Dice Snake, *Natrix tessellata* (Laurenti, 1768) on Cyprus. – *Zoology in the Middle East* 27: 29-34.
- Göçmen, B., Arıkan, H., Çiçek, K., M.Z. Yıldız (2007): A serological comparison of the populations of the Levantine Viper, *Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758) in Cyprus and southern Turkey. – *North-western Journal of Zoology* 3: 75-80.
- Göçmen, B., Kaşot, N., Yıldız, M.Z., Sas, I., Akman, B., Alçıkaya, D.Y., S. Gücel (2008): Results of the herpetological trips to northern Cyprus. – *North-Western Journal of Zoology* 4: 139-149.
- Göçmen, B., Arıkan, H., Yıldız, M.Z., Mermer, A., N. Alpagut-Keskin (2009): Serological characterization and confirmation of the taxonomic status of *Montivipera albizona* (Serpentes, Viperidae) with an additional new locality record and some phylogenetical comments. – *Animal Biology* 59: 87-96.
- Goodman, M.F., Gore, W.C., Muzyczka N., M.J. Bessman (1974): Studies on the biochemical basis of spontaneous mutation: III. Rate model for DNA polymerase-effected nucleotide misincorporation. – *Journal of Molecular Biology* 88: 423-435.
- Gould, S.J., N. Eldredge (1977): Punctuated equilibria; the tempo and mode of evolution reconsidered. – *Paleobiology* 3: 115-51.
- Gowri-Shankar, V., M. Rattray (2007): A reversible jump method for bayesian phylogenetic inference with a nonhomogeneous substitution model. – *Mol. Biol. Evol.* 24: 1286-1299.
- Graham, R.W. (1996): FAUNMAP – An electronic database documenting late Quaternary distributions of mammal species. III. State Mus. GIS Lab. <http://www.museum.state.il.us/research/faunmap/aboutfaunmap.html>.
- Graham, R.W., J.I. Mead (1987): Environmental fluctuations and evolution of mammalian faunas during the last deglaciation in North America. In: Ruddiman, W.F., H.E., Jr Wright [eds.], *North America and adjacent oceans during the last deglaciation*, *Geol. N. Am.*, K-3, pp. 371-402. Boulder, CO: Geol. Soc. Am.
- Graur, D., W. Martin (2004): Reading the entrails of chickens: molecular timescales of evolution and the illusion of precision. – *Trends Genet.* 20: 80-86.
- Gray, J.E. (1842): Monographic synopsis of the vipers of the family Viperidae. – *Zool. Misc.* 2: 68-71.
- Greene, H.W., [ed] (1997): *Snakes: the evolution of mystery in nature*. – Berkeley: Univ. of California Press.

- Greene, H.W., D. Cundall (2000): Limbless tetrapods and snakes with legs. – *Science* 287: 1939-1941.
- Groombridge, B. (1980): A phyletic analysis of Viperine snakes. – Unpublished Ph.D. Thesis. City of London Polytechnic, London.
- Groombridge, B. (1986): Phyletic relationships among viperinae snakes. In: Roček, Z. [ed.], *Studies in Herpetology*, Prague pp. 219-222.
- Gruber, U. (2009): *Die Schlangen Europas*. – Franckh-Kosmos Verlag, pp. 248.
- Guicking, D., Griffiths, R.A., Moore, R.D., Joger, U., M. Wink (2005): Introduced alien or persecuted native? Resolving the origin of the viperine snake (*Natrix maura*) on Mallorca. – *Biodiversity and Conservation* 15: 3045-3054. (doi:10.1007/s10531-005-4878-y)
- Guindon, S., O. Gascuel (2003): A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. – *Syst. Biol.* 52: 696-704.
- Guindon, S., O. Gascuel (2003): PhyML: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. – *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Gumprecht, A., Tillak, F., Orlov, N.L., Captain, A., S. Ryabov (2004): *Asian Pitvipers*. – GeitjeBooks, pp. 368, Berlin.
- Günther, A.C.L.G. [ed] (1864): *Reptiles of British India*. – The Ray Society, London.
- Gutberlet Jr., R.L., M.B. Harvey (2002): Phylogenetic relationships of New World pitvipers as inferred from anatomical evidence. In: Schuett, G.W., Hoggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. [eds.], *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, UT, pp. 51-68.
- Gvoždik, V., Moravec, J., Klutsch, C., P. Kotlik (2010): Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (*Hyla*, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA variation, with a description of a new species. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1146-1166.
- Gvoždik, V., Koltik P., Jandzik, D., Cordos, B., I. Rehak (2007): Phylogenetic relationships among vipers of the *Vipera ursinii* – *renardi* complex. – *Programme and abstracts: 2d Biology of the Vipers Conf. Porto*, p. 50.
- Haas, G. (1951): On the present state of our knowledge of the herpetofauna of Palestine. – *Bull. Res. Counc. Isr.* 1: 67-95.
- Hall, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hamada, H., Petrino, M.G., Kakunaga, T., Seidman, M., B.D. Stollar (1984): Characterization of genomic poly (dT-dG) poly (dC-dA) sequences: Structure, organization, and conformation. – *Mol. Cell. Biol.* 4: 2610-2621.
- Haq, B.U., Hardenbol, J., P.R. Vail (1987): Chronology of fluctuations of sea levels since the Triassic. – *Science* 235: 1156-1167.
- Harding, K.A., K.R.G. Welch (1980): *Venomous snakes of the world. A checklist* – Pergamon Press, Oxford, 188 pp.
- Harpending, H.C. (1994): Signature of ancient population growth in a lowresolution mitochondrial DNA mismatch distribution. – *Hum. Biol.* 66: 591-600.
- Harpending, H.C., Sherry, S.T., Rogers, A.R., M. Stoneking (1993): The genetic structure of ancient human populations. – *Curr. Anthropol.* 34: 483-496.

- Harrigan, R.J., Mazza, M.E., M.D. Sorenson (2008): Computation vs. cloning: evaluation of two methods for haplotype determination. – *Molecular Ecology Resources* 8: 1239-1248. (doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02241.x)
- Harris, A.J., Q.-Y. Xiang (2009): Estimating ancestral distributions of lineages with uncertain sister groups: a statistical approach to dispersal-vicariance analysis and a case using *Aesculus* L. (Sapindaceae) including fossils. – *Journal of Systematics and Evolution* 47: 349-368.
- Harris, D.J., Batista, V., Carretero, M.A., N. Ferrand (2004): Assessment of genetic diversity within *Acanthodactylus erythrurus* (Reptilia: Lacertidae) in Morocco and the Iberian Peninsula using mitochondrial DNA sequence data. – *Amphibia-Reptilia* 25: 227-232.
- Harrison, R.G. (1989): Mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary genetics. – *Trends. Ecol. Evol.* 4: 6-11.
- Hartman, G. (2011): Reconstructing Mid-Pleistocene paleovegetation and paleoclimate in the Golan Heights using the  $\delta^{13}\text{C}$  values of modern vegetation and soil organic carbon of paleosols. – *Journal of Human Evolution* 60: 452-463.
- Harzhauser, M., Kroh, A., Mandic, O., Piller, W.E., Göhlich, U., Reuter, M., B. Berning (2007): Biogeographic responses to geodynamics: A key study all around the Oligo-Miocene Tethyan Seaway. – *Zoologischer Anzeiger* 246: 241-256.
- Hassanin, A. (2006): Phylogeny of Arthropoda inferred from mitochondrial sequences: Strategies for limiting the misleading effects of multiple changes in pattern and rates of substitution. – *Mol. Phyl. Evol.*, 38: 100-116.
- Feng, J., E. Zhao (2010): The complete mitochondrial genome of the Sichuan hot-spring keel-back (*Thermophis zhaoermii*, Serpentes: Colubridae) and a mitogenomic phylogeny of the snakes. – *Mitochondrial DNA*, 21: 8-18.
- Head, J.J. (2005): Snakes of the Siwalik group (Miocene of Pakistan): Systematics and relationship to environmental change. – *Palaeont. Electronica* 8: 1-33.
- Head, J.J., Bloch, J.I., Hastings, A.K., Bourque, J.R., Cadena, E.A., Herrera, F.A., Polly, P.D., C.A. Jaramillo (2009): Giant boid snake from the Palaeocene neotropics reveals hotter past equatorial temperatures. – *Nature* 457: 715-718.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., J.R. deWaard (2002): Biological identifications through DNA barcodes. – *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321. (doi 10.1098/rspb.2002.2218)
- Hedges, S.B., S. Kumar (2004): Precision of molecular time estimates. – *Trends Genet.* 20: 242-247.
- Hedges, S.B., S. Kumar (2009): Discovering the timetree of life. In: Hedges, S.B., S., Kumar [eds.], *The timetree of life*. New York: Oxford University Press, pp. 3-18.
- Hedges, S.B., Blair, J.E., Venturi, M.L., J.L. Shoe (2004): A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. – *BMC Evol. Biol.* 4: 2.
- Heise, P.J., Maxson, L.R., Dowling, H.G., S.B. Hedges (1995): Higher-level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA and 16S rRNA genes. – *Mol. Biol. Evol.* 12: 259-265.
- Henning, W. (2006): *Genetik*, Springer Berlin, pp. 853.
- Herrmann, H.-W., U. Joger (1995): Molecular data on the phylogeny of African vipers – preliminary results. In: Llorente, A., Montori, A., Santos, X., M.A. Carretero [eds.]: *Scientia herpetologica*: 92-97; Salamanca (Association Herpetologica Espanola).

- Herrmann, H.-W., U. Joger (1997): Evolution of Viperinae snakes. In: Thorpe, R.S., Wüster, W., A. Malhorta [eds.], *Venomous snakes: Ecology, evolution and snakebite*: 43-61; Symp. zool. Soc. Lond., 70, Oxford University Press.
- Herrmann, H.-W., Joger, U., G. Nilson (1992a): Molecular phylogeny and systematics of Viperinae snakes I. General phylogeny of European vipers (*Vipera* sensu stricto). In Korsos, Z., I. Kiss [eds.], *Proc. Sixth Ord. gen. Meet. S.E.H., Budapest*, pp. 219-224.
- Herrmann, H.-W., Joger, U., G. Nilson (1992b): Phylogeny and systematics of Viperinae snakes. III: Resurrection of the genus *Macrovipera* (Reuss, 1927) as suggested by biochemical evidence. – *Amphibia-Reptilia*, 13: 375-392.
- Herrmann, H.-W., Joger, U., Lenk, P., M. Wink (1999): Morphological and molecular phylogenies of viperines: conflicting evidence? – *Kaupia* 8: 21-30.
- Herrmann, H.-W., U. Joger, G. Nilson, C.G. Sibley (1987): First steps towards a biochemically based reconstruction of the phylogeny of the genus *Vipera*. In: van Gelder, J.J., Strijbosch, H., P.J.M. Bergers [eds.], *Proc. Fourth Ord. Gen. Meet. S.E.H., Nijmegen*, pp. 195-200.
- Hewitt, G. (2000): The genetic legacy of the quaternary ice ages. – *Nature* 405: 907-913.
- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F., A.D. Yoder (2010): Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 291-301.
- Hickson, R.E., Simon, C., Cooper, A.C., Spicer, G.S., Sullivan, J., D. Penny (1996): Conserved sequence motifs, alignment, and secondary structure for the third domain of animal 12S rRNA. – *Mol. Biol. Evol.* 13: 150-169.
- Himmelmann, L., D. Metzler (2009): TreeTime: An extensible C++ software package for Bayesian phylogeny reconstruction with time-calibration. – *Bioinformatics* 1-2, [<http://www.zi.biologie.unimuenchen.de/evol/statgen/software/treetime>].
- Ho, S.Y.W. (2007): Calibrating molecular estimates of substitution rates and divergence times in birds. – *J. Avian Biol.* 38: 409-414.
- Ho, S.Y.W., M.J. Phillips (2009): Accounting for calibration Uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times. – *Syst. Biol.* 58: 367-380.
- Ho, S.Y.W., Phillips M.J., Drummond, A.J., A. Cooper (2005): Accuracy of rate estimation using relaxed-clock models with a critical focus on the early metazoan radiation. – *Mol. Biol. Evol.* 22: 1355-1363.
- Holt, R.D. (1996): Demographic constraints in evolution: towards unifying the evolutionary theories of senescence and niche conservatism. – *Evol. Ecol.* 10: 1-11.
- Holt, R.D., M.S. Gaines (1992): Analysis of adaptation in heterogeneous landscapes: implications for the evolution of fundamental niches. – *Evol. Ecol.* 6: 433-447.
- Hongbao, M. (2005): Development application of polymerase chain reaction (PCR). – *The Journal of American Science* 1(3): 1-47.
- Hooker, J.J., M.E. Collinson, N.P. Sille (2004): "Eocene-Oligocene mammalian faunal turnover in the Hampshire Basin, UK: calibration to the global time scale and the major cooling event". – *Journal of the Geological Society* 161: 161. (doi:10.1144/0016-764903-091)
- Hraoui-Bloquet, S., Sadek, R.A., Sindaco, R., A. Venchi (2002): The herpetofauna of Lebanon: new data on distribution. – *Zoology in the Middle East* 27: 35-46.

- Hsü, K.J., Ryan, W.B.F., M.B. Cita (1973): Late Miocene desiccation of the Mediterranean. – *Nature* 242: 240-244.
- Hudson, R.R. (1983): Testing the constant rate neutral allele model with protein sequence data. – *Evolution* 37: 203-217.
- Hudson, R.R. (1990): Gene genealogies and the coalescent process. – *Oxford Surv. Evol. Biol.* 7: 1-44.
- Huelsenbeck, J.P., Larget, B., D. Swofford (2000): A compound poisson process for relaxing the molecular clock. – *Genetics* 154: 1879-1892.
- Hug, L.A., A.J. Roger (2007): The impact of fossils and taxon sampling on ancient molecular dating analyses. – *Mol. Biol. Evol.* 24: 1889-1897.
- Hugall, A.F., Foster, R., M.S.Y. Lee (2007): Calibration choice, rate smoothing, and the pattern of Tetrapod diversification according to the long nuclear gene RAG-1. – *Syst. Biol.* 56: 543-563.
- Inagaki, Y., Susko, E., Fast, N.M., A.J. Roger (2004): Covarion shifts cause a long-branch attraction artifact that unites microsporidia and archaebacteria in EF-1 $\alpha$  phylogenies. – *Mol. Biol. Evol.* 21: 1340-1349.
- Inoue, J., Donoghue, P.C., Z. Yang (2010): The impact of the representation of fossil calibrations on bayesian estimations of species divergence times. – *Syst. Biol.* 59: 74-89.
- Jackman, T.R., Bauer, A.M., Greenbaum, E., Glaw, F., M. Vences (2008): Molecular phylogenetic relationships among species of the Malagasy-Comoran gecko genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae). – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 74-81.
- Janke, A., U. Arnason (1997): The complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent Archosauria (birds and crocodiles). – *Mol. Biol. Evol.* 14: 1266-1272.
- Janke, A., Erpenbeck, D., Nilsson, M., U. Arnason (2001): The mitochondrial genomes of the iguana (*Iguana iguana*) and the caiman (*Caiman crocodylus*): Implications for amniote phylogeny. – *Proc. R. Soc. Lond., B* 268: 623-631.
- Jansson, R., M. Dynesius (2002): The fate of clades in a world of recurrent climatic change: Milankovitch oscillations and evolution. – *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33: 741-77.
- Jeffroy, O., Brinkmann, H., Delsuc, F., H. Philippe (2006): Phylogenomics: the beginning of incongruence? – *Trends in Genetics* 22: 225-231.
- Jesus, J., Brehm, A., D.J. Harris (2002): Relationships of *Tarentola* (Reptilia: Gekkonidae) from the Cape Verde Islands estimated from DNA sequence data. – *Amphibia-Reptilia* 23: 47-54.
- Jiang, Z.J., Castoe, T.A., Austin, C.C., Burbrink, F.T., Herron, M.D., McGuire, J.A., Parkinson, C.L., D.D. Pollock (2007): Comparative mitochondrial genomics of snakes: extraordinary substitution rate dynamics and functionality of the duplicate control region. – *BMC Evol. Biol.* 7: 123. (doi:10.1186/1471-2148-7-123)
- Jimenez-Moreno, G., Popescu, S.-M., Ivanov, D., J.-P. Suc (2007): Neogene flora, vegetation and climate dynamics in southeastern Europe and the northeastern Mediterranean. In: Williams, M., Haywood, A.M., Gregory, F.J. & Schmidt, D.N. [eds.], *Deep-time Perspectives on climate change: marrying the signal from computer models and biological proxies*. – The Micropalaeontological Society, Special Publications. The Geological Society, London, 503-516.
- Joannin, S., Cornée, J.-J., Münch, P., Fornari, M., Vasiliev, I., Krijgsman, W., Nahapetyan, S., Gabrielyan, I., Ollivier, V., Roiron, P., C. Chataigner (2010): Early Pleistocene climate cycles in

- continental deposits of the Lesser Caucasus of Armenia inferred from palynology, magnetostratigraphy, and  $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$  dating. – *Earth and Planetary Science Letters* 291: 149-158.
- Joger, U. (1984): The venomous snakes of the Near and Middle East. – Beihefte zum Tübinger Atlas des Vorderen Orients, Reihe A, Nr. 12: 1- 115.
- Joger, U. (2005): *Montivipera* Nilson, Tuniyev, Andrén, Orlov, Joger & Herrmann (1999). In: Joger U., Stümpel N. [eds.], Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III, Aula-Verlag.
- Joger, U., K. Courage (1999): Are palearctic 'Rattlesnakes' (*Echis* and *Cerastes*) monophyletic? – *Kaupia* 8: 65-81.
- Joger, U., O. Dely (2005): *Vipera (Pelias) renardi* (Christoph, 1861) – Steppenotter. In: Joger, U., N. Stümpel [eds.], Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III, AULA-Verlag, Wiesbaden, pp. 343-354.
- Joger, U., H.-W. Herrmann (1993): Ein immunologisch rekonstruierter Stammbaum der paläarktischen Vipern (Viperinae). – *Verh. Dt. zool. Ges.*, 86: 52.
- Joger, U., J. Luckhardt (2007): Schlangen und Drachen, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, pp. 216.
- Joger, U., N. Stümpel (2005a): 2.2.4 Viperidae – Vipern. In: Joger, U., N. Stümpel [eds.], Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III, AULA-Verlag, Wiesbaden, pp. 1-4.
- Joger, U., N. Stümpel (2005b): *Vipera*. In: Joger, U., N. Stümpel [eds.], Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III, AULA-Verlag, Wiesbaden, pp. 77-79.
- Joger, U., N. Stümpel [eds.] (2005c): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III, AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Joger, U., G. Nilson (2005): *Montivipera xanthina* (Gray, 1849) – Bergotter. In: Joger, U., N. Stümpel [eds.], Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III, Aula-Verlag, pp. 63-76.
- Joger, U., Herrmann, H.-W., G. Nilson (1992): Molecular phylogeny and systematics of the Viperidae, II: A revision of the *Vipera ursinii* complex. – *Proc. 6th Ordinary General meeting SEH, Budapest 1991*: 239-244.
- Joger, U., Teynié, A., D. Fuchs (1988): Morphological characterization of *Vipera wagneri* Nilson & Andrén, 1984 (Reptilia: Viperidae), with first description of the males. – *Bonn zool. Beitr.* 39: 221-228.
- Joger, U., Fritz, U., Guicking, D., Kalyabina-Hauf, S., Nagy, Z.T., M. Wink (2007): Phylogeography of western Palaearctic reptiles – Spatial and temporal speciation patterns. – *Zoologischer Anzeiger* 246: 293-313.
- Joger, U., Lenk, P., Baran, I., Böhme, W., Ziegler, T., Heidrich, P., M. Wink (1997): The phylogenetic position of *Vipera barani* and *V. nikolskii* within the *Vipera berus* complex. In: Böhme, W. Bischoff, W., T. Ziegler [eds.], *Herpetologica Bonnensis* 185-194, Bonn.
- Jones, M.D., Roberts, N.C., M.J. Leng (2007): Quantifying climatic change through the last glacial-interglacial transition based on lake isotope paleohydrology from central Turkey. – *Quaternary Research* 67: 463-473.
- Jordan, D.S. (1908): The law of geminate species. – *Am. Nat.* 42: 73-80.

- Jost, A., Fauquette, S., Kageyama, M., Krinner, G., Ramstein, G., Suc, J.-P., S. Violette (2009): High resolution climate and vegetation simulations of the late Pliocene, a model-data comparison over western Europe and the Mediterranean region. – *Climate of the Past* 5: 585–606.
- Kalyabina-Hauf, S., Schweiger, S., Joger, U., Mayer, W., Orlov, N., M. Wink (2004): Phylogeny and systematics of adders (*Vipera berus* complex). – *Mertensiella* 15: 7-15. In: Joger, U. & R. Wollesen [eds.], *Verbreitung, Ökologie und Schutz der Kreuzotter (Vipera berus [Linnaeus, 1758])*, Rheinbach.
- Karol, K.G., McCourt, R.M., Cimino, M.T., C.F. Delwiche (2001): The closest living relatives of land plants. – *Science* 294: 2351-2353.
- Kasapidis, P., Magoulas, A., Mylonas, M., E. Zouros (2005): The phylogeography of the gecko *Cyrtopodion kotschy* (Reptilia: Geckonidae) in the Aegean archipelago. – *Mol. Phyl. and Evol.* 35: 612-623.
- Kaufman, D.M. (1995): Diversity of New World mammals: universality of the latitudinal gradients of species and bauplans. – *J. Mammal.* 76: 322-34.
- Kelchner, S.A., M.A. Thomas (2006): Model use in phylogenetics: nine key Questions. – *TRENDS in Ecology and Evolution* 22: 87-94.
- Kelly, C.R., Barker, N.P., M.H. Villet (2003): Phylogenetics of advanced snakes (Caenophidia) based on four mitochondrial genes. – *Systematic Biology*, 52: 439-459.
- Keohavong, P., Ling, L., Dias, C., W.G. Thilly (1993): Predominant mutations induced by the *Thermococcus litoralis*, vent DNA polymerase during DNA amplification in vitro. – *PCR Methods Applic.* 2: 288-292.
- Kimura, M. (1968): Evolutionary rate at the molecular level. – *Nature* 217: 624-626.
- Kimura, M. (1983): *The neutral theory of molecular evolution*. – Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.
- Kingman, J.F.C. (1982a): On the genealogy of large populations. – *J. Appl. Probab. A* 19: 27-43. (doi: 10.2307/3213548)
- Kingman, J.F.C. (1982b): The coalescent. – *Stochast. Process Appl.* 13: 235-248. (doi: 10.1016/0304-4149(82)90011-4)
- Kinkelin, F. (1892): Ein fossiler Giftzahn. – *Zoologischer Anzeiger*, 15: 93-94.
- Kishino, H., M. Hasegawa (1989): Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. – *J. Mol. Evol.* 29: 170-179.
- Kishino, H., Thorne, J.L., W.J. Bruno (2001): Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. – *Mol. Biol. Evol.* 18: 352-361.
- Kjer, K. (2004): Aligned 18S and insect phylogeny. – *Syst. Biol.* 53: 506-514.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., H.G. Khorana (1971): Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases. – *J. Mol. Biol.* 56: 341-361.
- Knowles, L.L. (2004): The burgeoning field of statistical phylogeography. – *Journal of Evolutionary Biology* 17: 1-10.
- Kochva, E. (1978): Oral glands of the Reptilia. In: Gans, C.K. & A. Gans [eds.], *Biology of the Reptilia*. Vol. 8. *Physiology B*. Academic Press, New York, pp. 43-162.



- Koçyiğit, A., A. Özacar (2003): Extensional neotectonic regime through the NE Edge of the outer Isparta Angle, SW Turkey: New field and seismic data. – Turkish J. Earth Sci. 12: 67-90.
- Kodandaramaiah, U. (2009): Vagility: The neglected component in historical biogeography. – Evol. Biol. 36: 327-335
- Kodandaramaiah, U., N. Wahlberg (2007): Out-of-Africa origin and dispersal mediated diversification of the butterfly genus *Junonia* (Nymphalidae: Nymphalinae). – Journal of Evolutionary Biology, 20: 2181-2191.
- Koonin, E.V. (2005): Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. – Annu. Rev. Genet. 39: 309-38.
- Koufos, G.D., Zouros, N., O. Mourouzidou (2003): *Prodeinotherium bavaricum* (Proboscidea, Mammalia) from Lesvos Island, Greece; the appearance of deinotheres in the Eastern Mediterranean. – Geobios 36: 305-315.
- Kramer, E., H. Schnurrenberger (1959): Zur Systematik libyscher Schlangen. – Mitteilungen der naturforschenden Gesellschaft Bern 17: 1-17.
- Kratzer, H. (1968): Zur Fortpflanzung von *Vipera lebetina mauritanica*. – DATZ 21: 380-382.
- Krause, D.W., Prasad, G.V.R., von Koenigswald, W., Sahni, A., F.E. Grine (1997): Cosmopolitanism among Gondwanan Late Cretaceous mammals. – Nature 390, 504-507.
- Krecsák, L., D. Bohle (2008): The eccentric Adder man: a note on the life and works of Albert Franz Theodor Reuss (1879-1958). – Herpetological Bulletin 103: 1-10.
- Kühnelt, W. (1943): Die Leitformenmethode in der Ökologie der Landtiere. – Biologia Generalis, Wien 17: 106-146.
- Kuhner, M.K. (2008): Coalescent genealogy samplers: windows into population history. – Trends Ecol. Evol. 24: 86-93.
- Kukushkin, O.V. (2009): *Vipera renardi puzanovi* ssp. nov. (Reptilia: Serpentes: Viperidae) as a new subspecies of steppe viper from mountain Crimea. – СОВРЕМЕННАЯ ГЕРПЕТОЛОГИЯ 9: 18-40.
- Kumar, S. (2005): Molecular clocks: four decades of evolution. – Nat. Rev. Genet. 6: 654-662.
- Kumazawa, Y. (2004): Mitochondrial DNA sequences of five squamates: phylogenetic affiliation of snakes. – DNA Res. 11:137-144
- Kumazawa, Y. (2007): Mitochondrial genomes from major lizard families suggest their phylogenetic relationships and ancient radiations. – Gene 388: 19-26.
- Kumazawa, Y., M. Nishida (1995): Variations in mitochondrial tRNA gene organization of Reptiles as phylogenetic marker. – Mol. Biol., 12: 752-772.
- Kumazawa, Y., M. Nishida (1999): Complete mitochondrial DNA sequences of the Green Turtle and Blue-Tailed Mole Skink: Statistical evidence for Archosaurian affinity of turtles. – Mol. Biol. Evol., 16: 784-792.
- Kumazawa, Y., Ota, H., T. Ozawa (1996): Gene rearrangements in snake mitochondrial genomes: highly concerted evolution of control-region-like sequences duplicated and inserted into a tRNA gene cluster. – Mol. Biol. Evol., 13: 1242-1254.
- Kumazawa, Y., Ota, H., Nishida, M., T. Ozawa (1998): The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. – Genetics, 150: 313-329.

- Kurter, A. (1991): Glaciers of Turkey. In: Williams, R.S., J.G. Ferrigno [eds.], Satellite image atlas of glaciers of the world, Middle East and Africa. – United States Geological Survey Professional Paper 1386-G, pp.1-29.
- Ladoukakis, E.D., E. Zouros (2001): Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. – Mol. Biol. Evol. 18: 1168-1175.
- Lamm, K.S., B.D. Redelings (2009): Reconstructing ancestral ranges in historical biogeography: properties and prospects. – J. Syst. Evol. 47: 369-382.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., D.G. Higgins (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. – Bioinformatics, 23: 2947-2948.
- Lartillot, N., H. Brinkmann, H. Philippe (2007): Suppressing long branch attraction artefacts in the animal phylogeny using a site-heterogeneous model. – BMC Evol. Biol. 7: S4.
- Lartillot, N., H. Philippe (2004): A Bayesian mixture model for across-site heterogeneities in the amino-acid replacement process. – Molecular Biology and Evolution 21: 1095-1109.
- Lartillot, N., Lepage, T., S. Blanquart (2009): PhyloBayes 3. A Bayesian software package for phylogenetic reconstruction and molecular dating. – Bioinformatics 25: 2286-2288.
- Latifi, M. (1991): The Snakes of Iran. – Contr. Herpetol., 7, Oxford, Ohio, VIII + 159 pp.
- Laurenti, J.N. (1768): Austriaci viennensis Specimen medicum, exhibens Synopsin reptilium emendatam cum experimentis circa venena et antidota reptilium austriacorum. – Wien (J.T. De Trattner), pp. 214.
- Lawson, R., Slowinski, J.B., Crother, B.I., F.T. Burbrink (2005): Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): new evidence from mitochondrial and nuclear genes. – Mol. Phyl. Evol., 37: 581-601.
- Leavitt, D.H., Bezy, R.L., Crandal, K.A., J.W., Jr Sites (2007): Multi-locus DNA sequence data reveal a history of deep cryptic vicariance and habitat-driven convergence in the desert night lizard *Xantusia vigilis* species complex (Squamata: Xantusiidae). – Mol. Ecol. 16: 4455-4481.
- Lee, M.S.Y. (1998): Convergent evolution and character correlation in burrowing reptiles: Towards a resolution of squamate relationships. – Biol. J. Linnean Soc., 65: 369-453.
- Lee, M.S.Y., M.W. Caldwell (1998): Anatomy and relationships of *Pachyrhachis problematicus*, a primitive snake with hindlimbs. – Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci., 353: 1521-1552.
- Lemey, P., Salemi, M.S., A.-M. Vandamme (2009): The phylogenetic handbook. Cambridge university press pp. 723.
- Lemey, P., D. Posada (2009): Introduction to recombination detection. In: Lemey, P., M. Salemi, A.-M. Vandamme [eds.], The phylogenetic Handbook, Cambridge university press pp. 493-518.
- Lemmon, A.R., E. Moriarty Lemmon (2008): A likelihood framework for estimating phylogeographic history on a continuous landscape. – Syst. Biol. 57: 544-561.
- Lemmon, A.R., M.C. Milinkovitch (2002): The metapopulation genetic algorithm: An efficient solution for the problem of large phylogeny estimation. – Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 10516-10521.
- Lenk, P., Kalyabina, S., Wink, M., U. Joger (2001): Evolutionary relationships among the true vipers (Viperinae) inferred from mitochondrial DNA sequences. – Molecular Phylogenetics and Evolution 19: 94-104.
- Lepage, T., D. Bryant, H. Philippe, N. Lartillot (2007): A general comparison of relaxed molecular clock models. – Mol. Biol. Evol. 24: 2669-2680.

- Leroy, S.A.G., Arpe, K., U. Mikolajewicz (in press): Vegetation context and climatic limits of the Early Pleistocene hominin dispersal in Europe. – Quaternary Science Reviews.
- Li, W.H. (1993): So, what about the molecular clock hypothesis? – Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 896-901.
- Librado, P., J. Rozas (2009): DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. – Bioinformatics 25: 1451-1452.
- Lieberman, B.S. (2000): Paleobiogeography. New York: Plenum/Kluwer Academic
- Lieberman, B.S. (2002): Phylogenetic biogeography with and without the fossil record: gauging the effects of extinction and paleontological incompleteness. – Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 178: 39-52.
- Lieberman, B.S. (2003): Paleobiogeography: The relevance of fossils to biogeography. – Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 34: 51-69.
- Lindahl, T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. – Nature 362: 709-715.
- Linder, H.P., Hardy, C.R., F. Rutschmann (2005): Taxon sampling effects in molecular clock dating: an example from the African restionaceae. – Mol. Phylogenet. Evol. 35: 569-582.
- Lisiecki, L.E., M.E. Raymo (2007): Plio-Pleistocene climate evolution: trends and transitions in glacial cycle dynamics. – Quat. Sci. Rev. 26: 56-69. (doi: 10.1016/j.quascirev.2006.09.005)
- Lockhart, P.J., Larkum A.W., Steel M., Waddell P.J., D. Penny (1996): Evolution of chlorophyll and bacteriochlorophyll: the problem of invariant sites in sequence analysis. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1930-1934.
- Lomolino, M.V., Riddle, B.R., J.H. Brown (2006): Biogeography. Sunderland: Sinauer Associates.
- Loomis, W.F., D.W. Smith (1990): Molecular phylogeny of *Dictyostelium discodeum* by protein sequence comparison. – Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 9093-9097.
- Lopez, P., Casane, D., H. Philippe (2002): Heterotachy, an important process of protein evolution. – Mol. Biol. Evol. 19: 1-7.
- Lopez, P., Forterre, P., H. Philippe (1999): The root of the tree of life in the light of the covarion model. – J. Mol. Evol. 49: 496-508.
- Luiselli, L.M., U. Agrimi (1991): Composition and variation of the diet of *Vipera aspis francisciredi* in relation to age and reproductive stage. – Amphibia-Reptilia 12: 137-144.
- Lymberakis, P., N. Poulakakis (2010): Three continents claiming an archipelago: The evolution of Aegean's herpetofaunal diversity. – Diversity 2: 233-255. (doi:10.3390/d2020233)
- Macey, J.R., Larson, A., Ananjeva, N.B., T.J. Papenfuss (1997): Evolutionary shifts of three major structural features in the mitochondrial genome among iguanian lizards. – J. Mol. Evol. 44: 660-674.
- Macey, J.R., Papenfuss, T.J., Kuehl, J.V., Fourcade, H.M., J.L. Boore (2004): Phylogenetic relationships among amphisbaenian reptiles based on complete mitochondrial genomic sequences. – Mol. Phylogenet. Evol. 33: 22-31. (doi:10.1016/j.ympev.2004.05.003)
- Madsen, T., R. Shine (1994): Costs of reproduction influence the evolution of sexual size dimorphism in snakes. – Evolution, 48: 1389-1397.
- Madsen, T., Shine, R., Olsson, M., H. Wittzell (1999): Conservation biology–restoration of an inbred adder population. – Nature 402: 34-35.

- Magallón, S.A. (2004): Dating lineages: molecular and paleontological approaches to the temporal framework of clades. – *Int. J. Plant Sci.* 165: 7- 21.
- Magallón, S.A., M.J. Sanderson (2001): Absolute diversification rates in Angiosperm clades. – *Evolution* 55: 1762-1780.
- Mallow, D., D. Ludwig, G. Nilson (2003): *True Vipers: Natural History and Toxinology of Old World Vipers*, Krieger Publishing Company, 410 pp.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G., P. Taberlet (2003): Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. – *Trends in Ecology and Evolution* 18: 189-197.
- Manolakou, P., Angelopoulou, R., G. Lavranos (2006): Sex determinants in the genome – Lessons from the animal kingdom. – *Coll. Antropol.* 30: 649-652.
- Marra, A.C. (2005): Pleistocene mammals of mediterranean islands. – *Quaternary International* 129: 5-14.
- Marshall, C.R. (1990): The fossil record and estimating divergence times between lineages – Maximum divergence times and the importance of reliable phylogenies. – *J. Mol. Evol.* 30: 400-408.
- Martínez-Freiría, F., Santos, X., Pleguezuelos, J.M., Lizana, M., J.C. Brito (2009): Geographical patterns of morphological variation and environmental correlates in contact zones: a multi-scale approach using two Mediterranean vipers (Serpentes). – *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 47: 357-367.
- Marx, H., Ashe, J. S., L. E. Watrous (1988): Phylogeny of viperine snakes (Viperinae): Part I. Character analysis. – *Field. Zool. (N. S.)* 51: 1-16.
- Matassi, G., Sharp, P.M., C. Gautier (1999): Chromosomal location effects on gene sequence evolution in mammals. – *Curr. Biol.* 9: 786-791.
- Matthee, C.A., Burzlaff, J.D., Taylor, J.F., S.K. Davis (2001): Mining the mammalian genome for artiodactyl systematics. – *Syst. Biol.* 50: 367-390.
- Mayor, A. (2008): *Greek fire, poison arrows, and scorpion bombs: biological & chemical warfare in the ancient world*. – New York, Overlook.
- McClusky, S., Balassanian, S., Barka, A., Demir, C., Ergintav, S., Georgiev, I., Gurkan, O., Hamburger, M., Hurst, K., Kahle, H., Kastens, K., Kekelidze, G., King, R., Kotzev, V., Lenk, O., Mahmoud, S., Mishin, A., Nadariya, M., Ouzounis, A., Paradissis, S., Peter, Y., Prilepin, M., Reilinger, R., Sanli, I., Seeger, H., Tealeb, A., Toksoz, M., G. Veis (2000): GPS constraints on plate motion and deformation in the eastern Mediterranean: Implications for plate dynamics. – *J. Geophys. Res.* 105: 5695-5719.
- McDowell, S. B., C. M. Bogert (1954): The systematic position of *Lanthanotus* and the affinities of anguimorph lizards. – *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 105: 1-142.
- McGlone, M.S. (2005): Goodbye Gondwana. – *Journal of Biogeography* 32: 739-40.
- Mebs, D. (2000): *Gifftiere: Ein Handbuch für Biologen, Toxikologen, Ärzte und Apotheker*. – Stuttgart, Wiss. Verl. -Ges., pp. 350.
- Mehrotra, R.C. (2003): Status of plant megafossils during the Early Paleogene in India. In: Wing, S.L., Gingerich, P.D., Schmitz, B., E. Thoma [eds.], *Causes and consequences of globally warming climates in Early Paleogene*. – *Geol. Soc. Amer. Spec. Paper*, Boulder, pp. 413-423.
- Mein, P. (1999): European Miocene mammal biochronology. In: Rössner, G., K. Heissig, [eds.], *The Miocene land mammals of Europe*. Dr. Fritz Pfeil Verlag, Munich, pp. 25-38.

- Mellars, P. (2006): A new radiocarbon revolution and the dispersal of modern humans in Eurasia. – *Nature* 439: 931-935.
- Meng, J., M.C. McKenna (1998): Faunal turnovers of Palaeogene mammals from the Mongolian Plateau. – *Nature* 394: 364-367.
- Mertens, R. (1951): Die Levante-Otter der Cycladen. – *Seckenbergiana* 32: 207-209.
- Mertens, R. (1967): Über *Lachesis libanotica* und den Status von *Vipera bornmuelleri*. – *Senck. biol.* 48: 153-159.
- Mertens, R., H. Wermuth (1960): Die Amphibien und Reptilien Europas. – Verlag Waldemar Kramer, Frankfurt/Main.
- Mertens, R., Darevsky, I.S., K. Klemmer (1967): *Vipera latifii*, eine neue Giftschlange aus dem Iran. – *Senck. biol.* 48: 161-168.
- Mertens, R., L. Müller (1928): Liste der Amphibien und Reptilien Europas. – *Abh. Senckenb. Naturf. Ges.*, Frankfurt Main 41: 1-62.
- Mertens, R., L. Müller (1940): Liste der Amphibien und Reptilien Europas (2. Liste). – *Abh. Senckenb. Naturf. Ges.*, Frankfurt Main 451: 1 - 56.
- Messenger, E., Lordkipanidze, D., Ferring, C.R., B. Deniaux (2008): Fossil fruit identification by SEM investigations, a tool for palaeoenvironmental reconstruction of Dmanisi site, Georgia. – *J. Archaeol. Sci.* 35: 2715-2725.
- Messerli, B. (1964): Der Gletscher am Erciyes Dag und das Problem der rezenten Schneegrenze im Anatolischen und Mediterranen Raum. – *Geographica Helvetica* 19: 19-34.
- Meyer, A., R. Zardoya (2003): Recent advances in the (molecular) phylogeny of vertebrates. – *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 34: 311-38.
- Mitchell, D., Willerslev, E., A. Hansen (2005): Damage and repair of ancient DNA. – *Mutation Research* 571: 265-276.
- Modesto, S.P., J.S. Anderson (2004): The phylogenetic definition of Reptilia. – *Syst. Biol.*, 53: 815-821.
- Moran, K., Backman, J., Brinkhuis, H., Clemens, S.C., Cronin, T., et al. (2006): The Cenozoic palaeoenvironment of the Arctic Ocean. – *Nature* 441: 601-5.
- Mosbrugger, V., Utescher, T., D.L. Dilcher (2005): Cenozoic continental climatic evolution of Central Europe. – *PNAS* 42: 14964-14969.
- Mudelsee, M., M. Schulz (1997): The Mid-Pleistocene climate transition: onset of 100 ka cycle lags ice volume build-up by 280 ka. – *Earth and Planetary Science Letters* 151: 117-123.
- Mudelsee, M., M.E. Raymo (2005): Slow dynamics of the Northern Hemisphere glaciation. – *Paleoceanography* 20, PA4022. (doi: 10.1029/2005PA001153)
- Mulder, J. (1994): Additional information on *Vipera albizona* (Reptilia, Serpentes, Viperidae). – *Deinsea* 1: 77-83.
- Mulder, J. (1995): Herpetological observations in Turkey (1987-1995). – *Deinsa* 2: 51-66.
- Müller, J., R.R. Reisz (2005): Four well-constrained calibration points from the vertebrate fossil record for molecular clock estimates. – *Bioessays* 27: 1069-1075.
- Müller, S., Hollatz, M., J. Wienberg (2003): Chromosomal phylogeny and evolution of gibbons (Hylobatidae). – *Hum. Genet.* 113: 1432-1203. (doi: 10.1007/s00439-003-0997-2)

- Müller, U.C., Pross, J., Tzedakis, P.C., Gamble, C., Kotthoff, U., Schmiedl, G., Wulf, S., K. Christanis (2011): The role of climate in the spread of modern humans into Europe. – *Quaternary Science Reviews* 30: 273-279.
- Murphy, W.J., Pringle, T.H., Crider, T.A., Springer, M.S., W. Miller (2007): Using genomic data to unravel the root of the placental mammal phylogeny. – *Genome Res.* 17: 413-421. (doi: 10.1101/gr.5918807)
- Nagy, Z.T., Joger, U., Guicking, D., M. Wink (2003): Phylogeography of the European whip snake *Coluber (Hierophis) viridiflavus* as inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome b gene and ISSR genomic fingerprinting. – *Biota* 3: 109-118.
- Nardi, F., Carapelli, A., Fanciulli, P.P., Dallai, R., F. Frati (2001): The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetradontophora bielanensis*: evidence for heteroplasmy and tRNA translocations. – *Mol. Biol. Evol.*, 18: 1293-1304.
- Nee, S. (2006): Birth-death models in macroevolution. – *Annu. Rev. Ecol. Evol.* 37: 1-17.
- Neigel, J.E., J.C. Avise (1986): Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In: Nevo, E. & S. Karlin. [eds.], *Evolutionary processes and theory*. Academic Press, New York, pp. 515-534.
- Nemec, W., N. Kazanci (1999): Quaternary colluvium in west-central Anatolia: sedimentary facies and palaeoclimatic significance. – *Sediment* 46: 139-170.
- Nikaido, M., Rooney, A., N. Okada (1999): Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales. – *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 10261-10266.
- Nilson, G. (2005): *Macrovipera schweizeri* (Werner, 1935) – Kykladenviper. In: Joger U., N. Stümpel [eds.], *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III*, Aula-Verlag, pp. 43-59.
- Nilson, G., C. Andrén (1984): Systematics of the *Vipera xanthina* complex (Reptilia: Viperidae) II. An overlooked viper within the *xanthina* species-group in Iran. – *Bonner Zoologische Beiträge* 35: 175-184.
- Nilson, G., C. Andrén (1985a): Systematics of the *Vipera xanthina* Complex (Reptilia: Viperidae). III. Taxonomic status of the Bulgar Dagħ Viper in South Turkey. – *Journal of Herpetology*, Houston, 19: 276-283.
- Nilson, G., C. Andrén (1985b): Systematics of the *Vipera xanthina* complex (Reptilia: Viperidae). I. A new Iranian viper in the *raddei* species-group. – *Amphibia-Reptilia* 6: 207-214.
- Nilson, G., C. Andrén (1986a): The mountain vipers of the Middle East – The *Vipera xanthina* complex (Reptilia, Viperidae). – *Bonner zoologische Monographien* 20: Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, Bonn.
- Nilson, G., C. Andrén (1986b): A review of the *Vipera xanthina* Complex (Reptilia: Viperidae). – *Studies in Herpetology*: 223-226, Prague.
- Nilson, G., C. Andrén (1988): *Vipera lebetina transmediterranea*, a new subspecies of viper from North Africa, with remarks on the taxonomy of *Vipera lebetina* and *Vipera mauritanica* (Reptilia: Viperidae). – *Bonn. zool. Beitr.* 39: 371-379.
- Nilson, G., C. Andrén (1992): The species concept in the *Vipera xanthina* complex: reflecting evolutionary history or hiding biological diversity? – *Amphibia-Reptilia* 13: 421-424.

- Nilson, G., C. Andrén (1997): Evolution, systematics and biogeography of Palearctic vipers. – Symp. Zool. Soc. Lond. 70: 31-42.
- Nilson, G., C. Andrén (2001): The meadow and steppe vipers of Europe and Asia – The *Vipera (Acridophaga) ursinii* complex. – Acta Zool. Acad. Scient Hung. 47: 87-267.
- Nilson, G., Andrén, C., B. Flärdh (1990): *Vipera albizona*, a new mountain viper from central Turkey, with comments on isolating effects of the Anatolian „Diagonal“. – Amphibia-Reptilia 11: 285-294.
- Nilson, G., Tuniyev, B.S., N. Orlov, N.L. Höggren, C. Andrén (1995): Systematics of the vipers of Caucasus: polymorphism or sibling species? – Asiatic Herp. Res. 6: 1-26.
- Nilson, G., Tuniyev, B., Andrén, C., Orlov, N. Joger, U., H-W. Herrmann (1999): Taxonomic position of the *Vipera xanthina* complex. – Kaupia, Darmstädter Beiträge zur Naturgeschichte 8: 99-102.
- Niskanene, M., J. Mappes (2005): Significance of the dorsal zigzag pattern of *Vipera latastei gaditana* against avian predators. – Journal of Animal Ecology 74: 1091-1101. (doi 10.1111/j.1365-2656.2005.01008.x.)
- Noonan, B.P., P.T. Chippindale (2006a): Dispersal and vicariance: the complex evolutionary history of boid snakes. – Mol. Phylogenet. Evol. 40: 347-358.
- Noonan, B.P., P.T. Chippindale (2006b): Vicariant origin of Malagasy reptiles supports late Cretaceous Antarctic landbridge. – Am. Nat. 168: 730-741.
- Notredame, C. (2007): Recent evolutions of multiple sequence alignment algorithms. – PLoS Comput. Biol. 3: e123.
- Novacek, M.J. (1999): 100 million years of land vertebrate evolution: the Cretaceous-Early Tertiary transition. – Ann. Mo. Bot. Gard. 86: 230-258.
- Nylander, J.A.A. (2004): MrModeltest v2. Programm distributed by the author. – Evolutionary Biology Center, Uppsala University (<http://www.abc.se/~nylander/>).
- Nylander, J.A.A., Olsson, U., Alström, P., I. Sanmartín (2008): Accounting for phylogenetic uncertainty in biogeography: A Bayesian approach to dispersal-vicariance analysis of the thrushes (Aves: Turdus). – Syst. Biol. 57: 257-268.
- O'Brien, T.G., Kinnaird, M.F., Dierenfeld, E.S. et al. (1998): Gene translocation links insects and crustaceans. – Nature 392: 667-668. (doi: 10.1038/33580)
- Obst, F.J. (1982): Zur Kenntnis der Schlangengattung *Vipera*. – Zool. Abh. staatl. Mus. Tierk. Dresden 38: 229-235.
- Okajima, Y., Y. Kumazawa (2009): Mitochondrial genomes of acrodont lizards: timing of gene rearrangements and phylogenetic and biogeographic implications. – BMC Evol. Biol. 10: 141.
- Okay, A. I. (2008): Geology of Turkey: a synopsis. – Anschnitt 21: 19-42.
- Opperdoes, F.R. (2009): Phylogenetic analysis using protein sequences. In: Lemey, P., Salemi, M., A.-M. Vandamme [eds.], The phylogenetic Handbook, Cambridge university press pp. 313-331.
- Orlov, N., B.S. Tuniyev (2005): *Vipera (Pelias) kaznakovii* Nikolskij, 1909 – Gemeine Kaukasusotter. In: Joger, U., N. Stümpel [eds.], Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III, AULA-Verlag, Wiesbaden, pp. 325-341.
- Ozel, E., A. Ulug, B. Pekcetinoz (2007): Neotectonic aspects of the northern margin of the adana-cilicia submarine basin, NE Mediterranean. – J. Earth Syst. 116: 113-124.
- Pääbo, S., A.C. Wilson (1988): Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. – Nature 334: 387-388.

- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., M. Hofreiter (2004): Genetic analyses from ancient DNA. – *Annu. Rev. Genet.* 38: 645-79.
- Page, R.D.M., E. Holmes (2001): *Molecular evolution, a phylogenetic approach*. Blackwell Science, pp. 346.
- Palombo, M.R. (2007): How can endemic proboscideans help us understand the “island rule”? A case study of Mediterranean islands. – *Quaternary International* 169-170: 105-124.
- Panchal, M., B.A. Beaumont (2007): The automation and evaluation of nested clade phylogeographic analysis. – *Evolution* 61: 1466-1480.
- Parkinson, C.L. (1999): Molecular systematics and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. – *Copeia* 576-586.
- Parolly, G. (2004): The high mountain vegetation of Turkey – a state of the art report, including a first annotated conspectus of the major syntaxa. – *Turk. J. Bot.* 28: 39-63.
- Pascual, R. (2006): Evolution and geography: the biogeographic history of South American land mammals. – *Ann. Mo. Bot. Gard.* 93: 209-30.
- Pereira, S.L. (2000): Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. – *Genetics and Molecular Biology*, 23: 745-752.
- Penny, D., Hendy, M.D., M.A. Steel (1992): Progress with methods for constructing evolutionary trees. – *Trends Ecol. Evol.* 7: 73-79.
- Pereira, S.L. (2000): Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. – *Genetics and Molecular Biology*, 23: 745-752.
- Perez-Lozada, M., Hoeg J., K. Crandall (2004): Unraveling the evolutionary radiation of the thoracican barnacles using molecular and morphological evidence: a comparison of several divergence time estimation approaches. – *Syst. Biol.* 53: 244-264.
- Perissoratis, C., N. Conispoliatis (2003): The impacts of sea-level changes during latest Pleistocene and Holocene times on the morphology of the Ionian and Aegean seas (SE Alpine Europe). – *Marine Geology* 196: 145- 156.
- Peterson, A.T., Soberón, J., V. Sanchez-Cordero (1999): Conservatism of ecological niches in evolutionary time. – *Science* 285: 1265-1267.
- Phelps, T. (2010): *Old World Vipers – A natural history of the Azemiopinae, and Viperinae*. Edition Chimaira, Frankfurt/Main.
- Philippe, H., Germot A., D. Moreira (2000): The new phylogeny of eukaryotes. – *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 596-601.
- Philippe, H., Snell, E.A., Baptiste, E., Lopez, P., Holland, P.W., D. Casane (2004): Phylogenomics of eukaryotes: impact of missing data on large alignments. – *Mol. Biol. Evol.* 21: 1740-1752.
- Pinho, C., Ferrand, N., D.J. Harris (2006): Reexamination of the Iberian and North African *Podarcis* (Squamata: Lacertidae) phylogeny based on increased mitochondrial DNA sequencing. – *Mol. Phylogenet. Evol.* 38: 266-273.
- Pisias, N.G., T.C., Jr Moore (1981): The evolution of Pleistocene climate: A time series approach, Earth Planet. – *Sci. Lett.* 52: 450-458.



- Pook, C.E., Joger, U., Stümpel, N., W. Wüster (2009): When continents collide: Phylogeny, historical biogeography and systematic of the medically important viper genus *Echis* (Squamata: Serpentes: Viperidae). – Mol. Phylogent. Evol. 53: 792-807.
- Popov, S.V., Rögl, F., Rozanov, A.Y., Steininger, F.F., Shcherba, I.G., M. Kovac [eds] (2004): Lithological-paleogeographic maps of Paratethy, 10 maps Late Eocene to Pliocene. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart.
- Posada, D. (2009): Selecting models of evolution. In: Lemey, P., Salemi, M., A.-M. Vandamme [eds.], The phylogenetic Handbook, Cambridge university press pp. 345-361.
- Posada, D., T.R. Buckley (2004): Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. – Syst. Biol. 53: 793-808.
- Posada, D., K.A. Crandall (1998): ModelTest: testing the model of DNA substitution. – Bioinformatics 14: 817-818.
- Posada, D., K.A. Crandall (2001): Intraspezifische gene genealogies: trees grafting into networks. – Trends in Ecology and Evolution 16: 37-45.
- Posada, D., K.A. Crandall, E.C. Holmes (2002): Recombination in evolutionary genomics. – Annual Reviews in Genetics 36: 75-97.
- Pough, F.H., Andrews, R.M., Cadle, J.E., Crump, M.L., Savitsky, A.H., Wells, K.D. (2004): Herpetology, 3rd Edition. – Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Poux C., Madsen, O., Glos J., de Jong, W.W., M. Vences (2008): Molecular phylogeny and divergence times of Malagasy tenrecs: influence of data partitioning and taxon sampling on dating analyses. – BMC Evol. Biol. 8: 102.
- Prasad, G.V.R., A. Sahni (1998): First Cretaceous mammal from India. – Nature 332: 638-640.
- Prasad, G.V.R., A. Sahni (1999): Were there size constraints on biotic exchanges during the northward drift of the Indian plate. – Proc. Ind. Nat. Sci. Acad. 65A: 377-396.
- Prasad, G.V.R., Verma, O., Gheerbrant, E., Goswami, A., Khosla, A., Parmar, V., A. Sahni (2010): First mammal evidence from the Late Cretaceous of India for biotic dispersal between India and Africa at the KT transition. – C. R. Palevol 9: 63-71.
- Psenner, H. (1940): Die Vipern Großdeutschlands, G. Wenzel & Sohn, Braunschweig.
- Pyron, R.A. (2009): A likelihood method for assessing molecular divergence time estimates and the placement of fossil calibrations. – Systematic Biology 59: 1-10. (doi:10.1093/sysbio/syp090)
- Rabineau, M., Berné, S., Olivet, J.-L., Aslanian, D., Guillocheau, F., P. Joseph (2006): Paleo sea levels reconsidered from direct observation of paleoshoreline position during glacial maxima (for the last 500, 000 yr). – Earth and Planetary Science Letters 252: 119-137.
- Rage, J.-C. (1996): Le peuplement animal de Madagascar: une composante venue de Laurasie est-elle envisageable? In: W.R. Lourenco [ed], Biogéographie de Madagascar, OTSTOM, Paris, pp. 27-35.
- Rage, J.-C., F. Escuillié (2003): The Cenomanian: stage of hindlimbed snakes. – Carnets de Géologie / Notebooks on Geology – Article 2003/01: 1-11.
- Rage, J.-C., C. Werner (1999): Mid-Cretaceous (Cenomanian) snakes from Wadi Abu Hashim, Sudan: the earliest snake assemblage. – Palaeontol. Afr. 35: 85-110.

- Rage, J.-C., Buffetaut, E., Buffetaut-Tong, H., Chaimanee, Y., Ducrocq, S., Jaeger, J.-J., V. Suteethorn (1992): A colubrid snake in the late Eocene of Thailand: the oldest known Colubridae (Reptilia, Serpentes). – C. R. Acad. Sci. Paris, II 314: 1085-1089.
- Rambaut, A. (2008): FigTree, tree figure drawing tool, version 1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., L. Bromham (1998): Estimating divergence dates from molecular sequences. – Mol. Biol. Evol. 15: 442-448.
- Rambaut, A., A.J. Drummond (2007): Tracer v1.4. Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramos-Onsins, S.E., J. Rozas (2002): Statistical properties of new neutrality tests against population growth. – Molecular Biology and Evolution 19: 2092-2100.
- Rand, D.M. (2001): The units of selection on mitochondrial DNA. – Annu. Rev. Ecol. Syst. 32: 415-448.
- Raymo, M.E., Lisiecki, L.E., K.H. Nisancioglu (2006): Plio-Pleistocene ice volume, Antarctic climate, and the global  $\delta^{18}\text{O}$  record. – Science 313: 492-495. (doi: 10.1126/science.1123296)
- Ree, R.H., S.A. Smith (2008): Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. – Systematic Biology 57: 4-14.
- Regier, J.C., Shultz, J.W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., Martin, J.W., C.W. Cunningham (2010): Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. – Nature 463: 1079-1083. (doi: 10.1038/nature08742)
- Reilinger, R.E., McClusky, S.C., Oral, M.B., King, R.W., M.N. Toksöz (1997): Global Positioning System measurements in the Arabia-Africa-Eurasia plate collision zone. – J. Geophys. Res. 102: 9983-9999.
- Reiss, R.A., Schwert, D.P., A.C. Asworth (1995): Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. – Environmental Entomology 24: 716-719.
- Reisz, R.R., J. Müller (2004): Molecular timescales and the fossil record: a paleontological perspective. – Trends in Genetics 20: 237-241.
- Rest, J.S., Ast, J.C., Austin, C.C., Waddell, P.J., Tibbetts, E.A., Hay, J.M., D. Mindell (2003): Molecular systematics of primary reptilian lineages and the tuatara mitochondrial genome. – Mol. Phyl. Evol., 29: 289-297.
- Reynoso, V.H. (1998): *Huehucuetzpalli mixtecus* gen. et sp. nov: A basal squamate (Reptilia) from the Early Cretaceous of Tepexi de Rodriguez, Central Mexico. – Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci., 353: 477-500.
- Ricklefs, R.E., R.E. Latham (1992): Intercontinental correlation of geographical ranges suggests stasis in ecological traits of relict genera of temperate perennial herbs. – Am. Nat. 139: 1305-1321.
- Roberts, N., H. Wright (1993): Vegetational, lake-level, and climatic history of the Near East and southwest Asia. In: Wright, H.E., Kutzback, J.E., Webb, T., Ruddiman, W.F., Street-Perott, F.A., Bartlein, P.J. [eds.], Global climates since the Last Glacial Maximum. COHMAP Volume. Minneapolis: University of Minnesota Press. pp 194-220.
- Robinson, S.A., Black, S., Sellwood, B.W., P.J. Valdes (2006): A review of palaeoclimates and palaeoenvironments in the Levant and Eastern Mediterranean from 25,000 to 5,000 years BP: setting the environmental background for the evolution of human civilization. – Quaternary Science Reviews 25: 1517-1541.

- Rogers, A.R., Fraley, A.E., Bamshad, M.J., Watkins, W.S., L.B. Jorde (1996): Mitochondrial mismatch analysis is insensitive to the mutational process. – *Molecular Biology and Evolution* 13: 895-902.
- Rogers, A.R., H. Harpending (1992): Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. – *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Rögl, F. (1999): Mediterranean and Paratethys. Facts and hypotheses of an Oligocene to Miocene paleogeography (short overview). – *Geologica Carpathica* 50: 339-349.
- Rohling, E.J., Fenton, M., Jorissen, F.J., Bertrand, P., Ganssen, G., J.P. Caulet (1998): Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500, 000 years. – *Nature* 394: 162-165.
- Rokas, A., P.W.H. Holland (2000): Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. – *Trends Ecol. Evol.* 15: 454-459. (doi: 10.1016/S0169-5347(00)01967-4)
- Rokas, A., Williams, B.L., King, N., S.B. Carroll (2003): Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. – *Nature* 425: 798-803.
- Ronquist, F. (1996): DIVA version 1.1. Computer program and manual available from Uppsala University ([www.ebc.uu.se/systzoo/research/diva/diva.html](http://www.ebc.uu.se/systzoo/research/diva/diva.html)).
- Ronquist, F. (1997): Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. – *Systematic Biology* 46: 195-203.
- Ronquist, F., J.P. Huelsenbeck (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. – *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Ronquist, F., P. van der Mark, J.P. Huelsenbeck (2009): Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. In: Lemey, P., Salemi, M., A.-M. Vandamme [eds.]: *The phylogenetic Handbook*, Cambridge university press pp. 210-236.
- Root, T. (1988): Environmental factors associated with avian distributional boundaries. – *J. Biogeogr.* 15: 489-505.
- Ruddiman, W.F. (2006): Orbital changes and climate. – *Quaternary Science Reviews* 25: 3092-3112.
- Russo, C.A., Takezaki, N., M. Nei (1996): Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. – *Mol. Biol. Evol.* 13: 525-536.
- Rutschmann, F., Eriksson, T., Abu Salim K., E. Conti (2007): Assessing calibration uncertainty in molecular dating: the assignment of fossils to alternative calibration points. – *Syst. Biol.* 56: 591-608.
- Sahni, A., G.V.R. Prasad (2009): Geodynamic evolution of the Indian plate: consequences for dispersal and distribution of biota. – *Mem. Geol. Soc. Ind.* 66: 203-225.
- Şahoğlu, V. (2005): The Anatolian trade network and the Izmir region during the early bronze age. – *Oxford Journal of Archeology* 24: 339-361.
- Saint Girons, H. (1976): Les différents types de cycles sexuels des mâles chez les Vipères européennes. – *C.R. Acad. Sc., Paris, Serie D*, 282: 1017-1019.
- Saint Girons, H. (1978): Morphologie externe comparée et systématique des Vipères d'Europe (Reptilia, Viperidae). – *Revue suisse Zool.* 85: 565-595, Genève.
- Saint Girons, H. (1980): Biogéographie et évolution des Vipères Européennes. – *C.R.Soc. Biogéogr.* 496: 146-172.
- Salemi, M. (2009): Genetic distances and nucleotide substitution models – Practice. In: Lemey, P., Salemi, M., A.-M. Vandamme [eds.], *The phylogenetic Handbook*, Cambridge university press pp. 126-141.

- Salminen, M., D. Martin (2009): Detecting and characterizing individual recombination events. In: Lemey, P., Salemi, M., A.-M. Vandamme [eds.], *The phylogenetic Handbook*, pp. 519-548.
- Salzmann U., Haywood, A.M., Lunt, D.J., Valdes, P.J., D.J. Hill (2008): A new global biome reconstruction and data-model comparison for the Middle Pliocene. – *Global Ecol. Biogeogr.* 17: 432-447.
- Sanders, K.L., Lee, M.S.Y., Leijds, R., Foster, R., J.S. Keogh (2008): Molecular phylogeny and divergence dates for Australasian Elapids and Sea Snakes (Hydrophiinae): evidence from seven genes for rapid evolutionary radiations. – *J. Evol. Biol.* 21: 682-695.
- Sanders, K.L., Mumpuni, A. Hamidy, J.J. Head, D.J. Gower (2010): Phylogeny and divergence times of file snakes (*Acrochordus*): Inferences from morphology, fossils and three molecular loci. – *Mol. Phylogenet. Evol.* 56: 857-867.
- Sanderson, M.J. (1997): A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. – *Mol. Biol. Evol.* 14: 1218-1231.
- Sanderson, M.J. (1998): Estimating rate and time in molecular phylogenies: Beyond the molecular clock? In: D.E. Soltis, Soltis, P.S., J.J. Doyle, [eds.], *Molecular systematics of plants II; DNA sequencing*, Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, pp. 242-264.
- Sanderson, M.J. (2002): Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. – *Mol. Biol. Evol.* 19: 101-109.
- Sanderson, M.J. (2003): r8s: Inferring absolute rates of molecular absence of a molecular clock. – *Bioinformatics* 19: 301-302.
- Sanderson, M.J., Thome J.L., Wikstrom, N., K. Bremer (2004): Molecular evidence on plant divergence times. – *Am. J. Bot.* 91: 1656-1665.
- Sanger, F., Nicklen, S., A.R. Coulson (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467. (doi: 10.1073/pnas.74.12.5463. PMID 271968.)
- Sanmartín, I., F. Ronquist (2004): Southern hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. – *Systematic Biology* 53: 216-43.
- Sanmartín, I., Enghoff, H., F. Ronquist (2001): Patterns of animal dispersal, vicariance and diversification in the Holarctic. – *Biological Journal of the Linnean Society* 73: 345-390.
- Sanmartín, I., van der Mark, P., F. Ronquist (2008): Inferring dispersal: A Bayesian approach to phylogeny-based island biogeography, with special reference to the Canary Islands. – *Journal of Biogeography* 35: 428-449.
- Şapaş, A., A. Boztepe-Güney (2009): Shear wave splitting in the Isparta Angle, southwestern Turkey: Anisotropic complexity in the mantle. – *J. Earth Syst. Sci.* 118: 71-80.
- Sarich, V.M., A.C.I. Wilson (1967): Immunological time scale for hominid evolution. – *Science* 158: 1200-1203.
- Sarıkaya, M.A., Zreda, M., A. Çiner (2009): Glaciations and paleoclimate of Mount Erciyes, central Turkey, since the last glacial maximum, inferred from <sup>36</sup>Cl cosmogenic dating and glacier modeling. – *Quaternary Science Reviews* 28: 2326-2341.
- Ščerbak, N., W. Böhme (2005): *Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758)-Levante-Otter. In: Joger, U., N. Stümpel [eds.], *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III*, Aula-Verlag, pp. 25-42.

- Schätti, B., Baran I., H. Sigg (1991): Rediscovery of the Bolkar viper: morphological variation and systematic implication on the „*Vipera xanthina* complex“. – *Amphibia Reptilia* 12: 305 – 327.
- Schätti, B., Baran, I., H. Sigg (1992): The '*Vipera xanthina* complex' – a reply to Nilson and Andrén. – *Amphibia-Reptilia* 13: 425-425.
- Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M., A. von Haeseler (2002): TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. – *Bioinformatics* 18: 502-504.
- Schmidt, H.A., A. von Haeseler (2009): Phylogeny inference using maximum likelihood methods. In: Lemey, P., Salemi, M., A.-M. Vandamme [eds.], *The phylogenetic Handbook*, Cambridge university press pp. 181-209.
- Schmidtler, J.F., Göçmen, B., Yildiz, M.Z., Akman, B., Yalçinkaya, D., Z.T. Nagy (2009): Rediscovery of the snake genus *Eirenis* on Cyprus (Reptilia: Colubridae). – *Salamandra* 45: 15-23.
- Schmitt, T. (2009): Biogeographical and evolutionary importance of the European high mountain systems. – *Frontiers in Zoology* 6: 9. (doi: 10.1186/1742-9994-6-9)
- Schwarz, E. (1936): Untersuchungen über Systematik und Verbreitung der europäischen und mediterranen Ottern. – *Behringwerk-Mitteilungen*, Marburg a. d. Lahn 7: 159-362.
- Schweizer, H. (1931): Beitrag zur Kenntnis der *Vipera lebetina*, Levanteviper, aus Milos. – *Bl. Aquar. Terrar.* Kunde, Stuttgart 42: 383-386.
- Scotese, C.R. (2001): *Atlas of earth history*. – University of Texas, Arlington.
- Sequeira, F., Ferrand, N., D.J. Harris (2006): Assessing the phylogenetic signal of the nuclear beta-fibrinogen intron 7 in salamandrids (Amphibia: Salamandridae). – *Amphibia-Reptilia* 27: 409-418.
- Seutin, G., Lang, B.F., Mindell, D.P. & R. Morais (1994): Evolution of the WANCY region in amniote mitochondrial DNA. – *Mol. Biol. Evol.*, 11: 329-340.
- Shackleton, N.J., N.D. Opdyke (1976): Oxygen-isotope and palaeomagnetic stratigraphy of Pacific core V28-239 Late Pliocene to latest Pleistocene. – *Geological Society of America* 145: 449-464.
- Shapiro, B., Rambaut A., A.J. Drummond (2006): Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. – *Mol. Biol. Evol.* 23: 7-9.
- Shaw, K.L. (2002): Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: What mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. – *PNAS* 99: 16122-16127.
- Sheffield, N., Song, H., Cameron, S.L., M.F. Whiting (2009): Nonstationary evolution and compositional heterogeneity in beetle mitochondrial phylogenomics. – *Syst. Biol.* 58: 381-394.
- Shimodaira, H. (2002): An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. – *Syst. Biol.* 51: 492-508.
- Shimodaira, H., M. Hasegawa (2001): CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. – *Bioinformatics* 17: 1246-1247.
- Shine, R., X. Bonnet (2000): Snakes: a new "model organism" in ecological research?. – *Trends Ecol. Evol.* 15: 221-222.
- Sigg, H. (1987): Ein erster Fund von *Vipera raddei kurdistanica* in der Südosttürkei. – *Herpetofauna* 9: 24-26.

- Simon, C., Buckley, T.R., Frati, F., Stewart, J.B., A.T. Beckenbach (2006): Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. – *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 545-79.
- Simpson, G.G. (1940): Mammals and land bridges. – *Journal of the Washington Academy of Sciences* 30: 137-163.
- Simpson, G.G. (1951): The species concept. – *Evolution* 5: 285-98.
- Simpson, G.G. (1965): The geography of evolution. – Chilton Books, New York.
- Sindaco, R.G. Serra, M. Menegon (2006): New data on the Syrian herpetofauna, with a newly-recorded species of snake. – *Zoology in the Middle East* 37: 29-38.
- Sitar, V. (1964): Report on the phytopalaeontological investigations of the Tertiary deposits in the vicinity of Orivnica (Southern Slovakia). – *Geol. Sborn. Bratislava* 15: 75-78.
- Slatkin, M., R.R. Hudson (1991): Pairwise comparison for mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. – *Genetics* 129: 555-562.
- Smith, S.A., M.J. Donoghue (2008): Rates of molecular evolution are linked to life history in flowering plants. – *Science* 322: 86-89.
- Smith, S.A., C.W. Dunn (2008): Phyutility: a phyloinformatics tool for trees, alignments and molecular data. – *Bioinformatics* 24: 715-716.
- Smith N.G.C., A. Eyre-Walker (2003): Partitioning the variation in mammalian substitution rates. – *Mol. Biol. Evol.* 20:10-17.
- Smith, A.B., K.J. Peterson (2002): Dating the time origin of major clades: molecular clocks and the fossil record. – *Annu. Rev. Earth. Planet. Sci.* 30: 65-88.
- Smith, A.D., Lui, T.W.H., E.R.M. Tillier (2004): Empirical models for substitution in ribosomal RNA. – *Mol. Biol. Evol.* 21: 419-427.
- Smith, F.A., Brown, J.H., Haskell, J.P., Lyons S.K., Alroy J., et al. (2004): Similarity of mammalian body size across the taxonomic hierarchy and across space and time. – *Am. Nat.* 163: 672-91.
- Smith, A.B., Pisani, D., Mackenzie-Dodds, J., Stockley, B., Webster, B., T. Littlewood (2006): Testing the molecular clock: molecular and paleontological estimates of divergence times in the Echinoidea (Echinodermata). – *Mol. Biol. Evol.* 23: 1832-1851.
- Sondaar, P.Y., Dermitzakis, M.D., J. De Vos (1996): The paleogeography and faunal evolution of the land mammals of Crete. In: Reese, D.S. [ed.], *Pleistocene and Holocene fauna of Crete and its first settlers*. – Monograph in World Archeology 28. Prehistory Press, Madison, WI, pp. 61-67.
- Sotoadames, F.N., Robertson, H.M., S.H. Berlocher (1994): Phylogenetic utility of partial DNA sequences of G6PDH at different taxonomic levels in Hexapoda with emphasis on Diptera. – *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 723-736.
- Stamatakis, A. (2006): RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. – *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Steininger, F.F. (1999): The continental European Miocene. In: Rössner, G., Heissig, K. [eds.], *The Miocene land mammals of Europe*. Dr. Fritz Pfeil Verlag, Munich, pp. 9-24.
- Storfer, A., Murphy, M.A., Evans, J.S., Goldberg, C.S., Robinson, S., Spear, S.F., Dezzani, R., Delmelle, E., Vierling, L. L.P. Waits (2007): Putting the 'landscape' in landscape genetics. – *Heredity* 98:128–142.

- Stümpel, N., U. Joger (2009): Recent advances in phylogeny and taxonomy of Near and Middle Eastern Vipers – an update. – *ZooKeys* 31: 179-191.
- Suc, J.P. (1984): Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in Europe. – *Nature* 307: 429-432.
- Sues, H.D., P.E. Olsen (1990): Triassic vertebrates of Gondwana aspect from the Richmond Basin of Virginia. – *Science* 249: 1020-1023.
- Sullivan, J., P. Joyce (2005): Model selection in phylogenetics. – *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36: 445-466.
- Sullivan, J., D. L. Swofford (1997): Are guinea pigs rodents? The importance of adequate models in molecular phylogenetics. – *J. Mammal. Evol.* 4: 77-86.
- Svenning, J.-C. (2003): Deterministic Plio-Pleistocene extinctions in the European cool-temperate tree flora. – *Ecol. Lett.* 6: 646-653.
- Svenning, J.-C., S. Normand, F. Skov (2009): Plio-Pleistocene climate change and geographic heterogeneity in plant diversity-environment relationships. – *Ecography* 32: 13-21.
- Swenson, N.G., D.J. Howard (2005): Clustering of contact zones, hybrid zones, and phylogeographic breaks in North America. – *Am. Nat.* 166: 581-591.
- Swofford, D.L. (2001): PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and Other Methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford, D.L., J. Sullivan (2009): Phylogeny inference based on parsimony and other methods using Paup. In: Lemey, P., M. Salemi, A.-M. Vandamme [eds.], *The phylogenetic Handbook*, Cambridge university press pp. 267-312.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., D.M. Hillis (1996): Phylogenetic inference. In: Hillis, D.M., C. Moritz, B.K. Mable [eds.], *Molecular Systematics*, 2nd edn, pp. 407-514.
- Sytsma, K.J., Litt, A., Zjhra, M.L., Pires, J.C., Nepokroeff, M., Conti, E., Walker, J., P.G. Wilson (2004): Clades, clocks, and continents: Historical and biogeographical analysis of Myrtaceae, Vochysiaceae, and relatives in the southern hemisphere. – *Int. J. Plant Sci.* 165: 85-105.
- Szczerbak, N.N. (2003): Guide to the reptiles of eastern Palearctic. – Malabar, FA (Krieger), pp. 260.
- Szyndlar, Z., J.-C. Rage (1990): West Palearctic cobras of the genus *Naja* (Serpentes: Elapidae): interrelationships among extinct and extant species. – *Amphibia-Reptilia* 11: 385-400.
- Szyndlar, Z., J.-C. Rage (1999): Oldest fossil vipers (Serpentes: Viperidae) from the Old World. – *Kaupia* 8: 9-20.
- Szyndlar, Z., W. Böhme (1993): Die fossilen Schlangen Deutschlands: Geschichte der Faunen und ihrer Erforschung. – *Mertensiella* 3: 381-431.
- Tajima, F. (1983): Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. – *Genetics* 105: 437-460.
- Takahata, N., M. Nei (1985): Gene genealogy and variance of interpopulational nucleotide differences. – *Genetics* 110: 325-344.
- Talavera, G., J. Castresana (2007): Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. – *Syst. Biol.* 56: 564-577.
- Tassy, P. (1989): The proboscidean datum event: how many proboscideans and how many events? In: Lindsay, E.H., Fahlbusch, V., Mein, P. [eds.], *European Neogene mammal chronology*. NATO-ASI, A 180, pp. 237-252.

- Tateno, Y., Nei, M., F. Tajima (1982): Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. I. Distantly related species. – *Journal of Molecular Evolution* 18: 387-404.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. – *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471. (doi: 10.1093/nar/17.16.6463)
- Tavare, S. (1986): Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. – *Lect. Math. Sci.* 17: 57-86.
- Templeton, A.R. (1998): Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. – *Mol. Ecol.* 7: 381-397.
- Templeton, A.R. (2004): Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. – *Mol. Ecol.* 13: 789-810.
- Thomas, E. (1998): The biogeography of the late Paleocene benthic foraminiferal extinction. In: Aubry, M.-P., Lucas, S.G., W.A. Berggren [eds.]. *Late Paleocene-early Eocene biotic and climatic events in the marine and terrestrial records*: New York, Columbia University Press, pp. 214-243.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., T.J. Gibson (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. – *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680
- Thorne, J.L., H. Kishino (2002): Divergence time and evolutionary rate estimation with multilocus data. – *Syst. Biol.* 51: 689-702.
- Thorne, J.L., Kishino, H., I.S. Painter (1998): Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. – *Mol. Biol. Evol.* 15: 1647-1657.
- Townsend, T.M., Larson, A., Louis, E., R.J. Macey (2004): Molecular phylogenetics of Squamata: The position of snakes, amphisbaenians, and dibamids, and the root of the squamate tree. – *Syst. Biol.* 53: 735-757.
- Townsend, T.M., Alegre, R.E., Kelley, S.T., Wiens, J.J., T.W. Reeder (2008): Rapid development of multiple nuclear loci for phylogenetic analysis using genomic resources: An example from squamate reptiles. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 129-142.
- Trutnau, L. (1998): *Schlangen im Terrarium 2. Giftschlangen. Haltung, Pflege und Zucht*, Ulmer.
- Tubach, J. (2007): *Schlangen und Drachen in Mythos und Sage*. In: Joger, U., J. Luckhardt [eds.], *Schlangen und Drachen, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt* pp. 216.
- Tuniyev, B.S., Nilson, G., C. Andrén (2010): A new species of viper (Reptilia, Viperidae) from the Altay and Saur Mountains, Kazakhstan. – *Russian Journal of Herpetology* 17: 110 – 120.
- Tuniyev, B.S., S.V. Ostrovskikh (2001): Two new species of vipers of „*kaznakovi*“ complex (Ophidia, Viperinae) from the western Caucasus. – *Russian Journal of Herpetology* 8: 117-126.
- Tzedakis, P.C. (2007): Seven ambiguities in the Mediterranean palaeoenvironmental narrative. – *Quat. Sci. Rev.* 26: 2042-2066.
- Tzedakis, P.C., Hooghiemstra, H., H. Palike (2006): The last 1.35 million years at Tenaghi Philippon: revised chronostratigraphy and long-term vegetation trends. – *Quat. Sci. Rev.* 25: 3416-3430. (doi:10.1016/j.quascirev.2006.09.002)
- Underwood, G. (1977): Simplification and regeneration in the course of evolution of Squamate reptiles. – *Colloques Internationaux du Centre National de Recherches Scientifiques* 266: 341-352.
- Underwood, G., E. Kochva (1993): On the affinities of the burrowing asps *Atractaspis* (Serpentes: Atractaspididae). – *Zool. J. Linn. Soc.* 107: 3-64.



- Ursenbacher, S., Carlson, M., Helfer, V., Tegelström, H., L. Fumagalli (2006): Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. – Molecular Ecology. (doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03031.x)
- Ursenbacher, S., Schweiger, S., Tomović, L., Crnobrnja-Isailović, J., Fumagalli, L., W. Mayer (2008): Molecular phylogeography of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus (1758)): Evidence for high genetic diversity and multiple refugia in the Balkan peninsula. – Molecular Phylogenetics and Evolution 46: 1116-1128.
- Utiger, U.; B. Schätti (2004): Morphology and phylogenetic relationships of the Cyprus racer, *Hierophis cypriensis*, and the systematic status of *Coluber gemonensis gyarosensis* Mertens (Reptilia: Squamata: Colubrinae). – Rev. Suisse Zool. 111: 225-238.
- Valentine, J.W., Jablonski, D., D.H. Erwin (1999): Fossils, molecules and embryos: new perspectives on the Cambrian explosion. – Development 126: 851-859.
- van Andel, T.H., Davies, W., B. Weninger (2003): The human presence in Europe during the last glacial Period I: human Migrations and the changing climate. In: van Andel, T.H., Davies, W. [eds.], Neanderthals and Modern Humans in the European Landscape During the Last Glaciation. McDonald Institute Monographs, Cambridge, pp. 31-56.
- van Dam, J.A. (2006): Geographic and temporal patterns in the late Neogene (12-3 Ma) aridification of Europe: the use of small mammals as paleoprecipitation proxies. – Palaeogeog. Palaeoclim. Palaeoecol. 238: 190-218.
- van Hinsbergen, D.J.J., M.J. Dekkers, A. Koç (2010): Testing Miocene remagnetization of Bey Dağları: Timing and amount of Neogene rotations in SW Turkey. – Turkish J. Earth Sci. 19: 123-156.
- Varga Z.S., T. Schmitt (2008): Types of orreal and oreotundral disjunction in the western Palearctic. Biol. J. Linn. Soc. 93: 415-430.
- Vedmederya, V.J., Orlov, N.L., B.S. Tuniyev (1986): On taxonomy of three viper species of the *Vipera kaznakovi* complex. – Proc. Zool. Inst. Leningr. 157: 55-61.
- Vermeij, G.J. (1991): When biotas meet-understanding biotic interchange. – Science 253: 1099-104.
- Vidal, N., P. David (2004): New insights into the early history of snakes inferred from two nuclear genes. – Mol. Phyl. Evol. 31: 783-787.
- Vidal, N., S.B. Hedges (2002a): Higher-level relationships of caenophidian snakes inferred from four nuclear and mitochondrial genes. – Comptes Rendus Biologies, 325: 987-995.
- Vidal, N., S.B. Hedges (2002b): Higher-level relationships of snakes inferred from four nuclear and mitochondrial genes. – Comptes Rendus Biologies, 325: 977-985.
- Vidal, N., S.B. Hedges (2005): The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. – Comptes Rendus Biologies, 328: 1000-1008.
- Vidal, N., Rage, J.-C., Couloux, A., B. Hedges (2009): Snakes (Serpentes). In: Hedges, S.B., S. Kumar [eds.], The timetree of life. Oxford Biology pp. 390-397.
- Vidal, N., Delmas, A.-S., David, P., Cruaud, C., Couloux, A., S.B. Hedges (2007): The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. Comp. Rend. Biol., 330: 182-187.
- Völkl, W., B. Thiesmeier (2002): Die Kreuzotter, ein Leben in festen Bahnen? – Laurenti-Verlag, pp. 159.

- Voris, H.K. (2000): Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. – J. Biogeogr. 27: 1153-1167.
- Wallach, V. (1998): The visceral anatomy of blindsnakes and wormsnakes and its systematic implications (Serpentes: Anomalepididae, Typhlopidae, Leptotyphlopidae), PhD dissertation, Northeastern University, Boston.
- Warrell, D.A. (1995): Clinical toxicology of snakebite in Africa and the Middle East/Arabian Peninsula. In: Meier, J., J. White [eds.]. – Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 433-492.
- Webb, C.O., Ackerly, D.D., McPeck, M.A., M.J. Donoghue (2002): Phylogenies and community ecology. – Annu. Rev. Ecol. Syst. 33: 475-505.
- Weibel, A.C., W.S. Moore (2002): A test of a mitochondrial gene-based phylogeny of woodpeckers (genus *Picoides*) using an independent nuclear gene, beta-fibrinogen intron 7. – Mol. Phylogenet. Evol. 22: 247-257.
- Weiss, S., N. Ferrand (2007): Phylogeography of southern European refugia. – Springer Dordrecht.
- Welch, J.J., Fontanillas, E., L. Bromham (2005): Molecular dates for the “Cambrian explosion”: The influence of prior assumptions. – Syst. Biol. 54: 672-678.
- Werner, F. (1938): Eine verkannte Viper (*Vipera palaestinae* n. sp.). – Zool. Anz. 122: 313-318.
- Whelan, S., N. Goldman (2001): A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. – Molecular Biology and Evolution 18: 691-699.
- Wiens, J.J. (2004): Speciation and ecology revisited: Phylogenetic niche conservatism and the origin of species. – Evolution 58: 193-197.
- Wiens, J.J., Brandley, M.C., T.W. Reeder (2006): Why does a trait evolve multiple times within a clade? Repeated evolution of snakelike body form in squamate reptiles. – Evolution 60: 123-141.
- Wiens, J.J., M.J. Donoghue (2004): Historical biogeography, ecology and species richness. – Trends in Ecology and Evolution 19: 639-644.
- Wiens, J.J., Kuczyński, C.A., Smith, S.A., Mulcahy, D.G., Sites, Jr. J.W., Townsend, T.M., T.W. Reeder (2008): Branch lengths, support, and congruence: testing the phylogenomic approach with 20 nuclear loci in snakes. – Syst. Biol., 57: 420-431.
- Wiley, E.O., R.L. Mayden (1985): Species and speciation in phylogenetic systematics, with examples from the North American fish fauna. – Ann. MO Bot. Gard. 72: 596-635.
- Williams, J.W., Jackson, S.T., J.E. Kutzbach (2007): Projected distributions of novel and disappearing climates by 2100 AD. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 5738-5742.
- Willows-Munro, S., Robinson, T.J., C.A. Matthee (2005): Utility of nuclear DNA intron markers at lower taxonomic levels: phylogenetic resolution among nine *Tragelaphus* spp. – Mol. Phylogenet. Evol. 35: 624-636.
- Wilson, J.A., D.M. Mohabey, S.E. Peters, J.J. Head (2010): Predation upon hatchling Dinosaurs by a new snake from the late Cretaceous of India. – PLoS Biology 8: 1-10.
- Woodburne, M.O. (2004): Late Cretaceous and Cenozoic mammals of North America: Biostratigraphy and geochronology. New York: Columbia Univ. Press. 400 pp.
- Wu, C.I., W.H. Li (1985): Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 1741-1745.

- Wüster, W., Golay, P., D.A. Warrell (1997): Synopsis of recent developments in venomous snake systematics, No 2. – *Toxicon* 36: 299-307.
- Wüster, W., Peppin, L., Pook, C., D.E. Walker (2008): A nesting of Vipers: Phylogeny and historical biogeography of Viperidae (Squamata: Serpentes). – *Mol. Phylogent. Evol.* 49: 445-459.
- Wüster, W., Crookes, S., Ineich, I., Mane, Y., Pook, C.E., Trape, J.-F., D.G. Broadley (2007): The phylogeny of cobras inferred from mitochondrial DNA sequences: evolution of venom spitting and the phylogeography of the African spitting cobras (Serpentes: Elapidae: *Naja nigricollis* complex). – *Mol. Phylogenet. Evol.* 45: 437-453.
- Xia, X. (2009): Assessing substitution saturation with Dambe. In: Lemey, P., Salemi, M., A.-M. Vandamme [eds.]: *The phylogenetic Handbook*, Cambridge university press pp. 615-630.
- Xia, X., Hafner, M.S., P.D. Sudman (1996): On transition bias in mitochondrial genes of pocket gophers. – *Journal of Molecular Evolution* 43: 32-40.
- Xia, X., Z. Xie (2001): DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. – *Journal of Heredity* 92: 371-373.
- Xia, X., Xie, Z., M. Salemi, L. Chen, Y. Wang (2003): An index of substitution saturation and its application. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26 : 1-7.
- Yan, J., Hongdan, L., K. Zhou (2008): Evolution of the mitochondrial genome in snakes: Gene rearrangements and phylogenetic relationships. – *BMC Genomics*, 9: 569-576.
- Yang, Z. (1994): Estimating the pattern of nucleotide substitution. – *J. Mol. Evol.* 39: 105-111.
- Yang, Z. (1994): Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. – *J. Mol. Evol.* 39: 306-314.
- Yang, Z. (1997): PAML: A program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. – *CABIOS* 13: 555-556 (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>).
- Yang, Z. (2006): *Computational molecular evolution*. – Oxford: Oxford University Press.
- Yang, Z. (2007): PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. – *Mol. Biol. Evol.* 24: 1586-1591.
- Yang, Z., B. Rannala (2006): Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock using multiple fossil calibrations with soft bounds. – *Mol. Biol. Evol.* 23: 212-226.
- Yang, Z., A.D. Yoder (2003): Comparison of likelihood and Bayesian methods for estimating divergence times using multiple gene loci and calibration points, with application to a radiation of cutelooking mouse lemur species. – *Syst. Biol.* 52: 705-716.
- Yoder, A.D., M.D. Nowak (2006): Has vicariance or dispersal been the predominant biogeographic force in Madagascar? Only time will tell. – *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 37: 405-431.
- Yoder, A.D., Z. Yang (2000): Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks. – *Mol. Biol. Evol.* 17: 1081-1090.
- Yu, Y., Harris, A.J., X. He (2010): S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 848-850.
- Zachos, J.C., Dickens G.R., R.E. Zeebe (2008): An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon cycle dynamics. – *Nature* 451: 279-283.
- Zachos, J.C., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., K. Billups (2001): Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to the present. – *Science* 292: 686-693.

- Zachos, J.C., Wara, M.W., Bohaty, S., Delaney, M.L., Petrizzo, M.R., Brill, A., Bralower, T.J., I. Premoli-Silva (2003): A transient rise in tropical sea surface temperature during the Paleocene-Eocene thermal maximum. – *Science* 302: 1551-1554.
- Zaher, H. (1999): Hemipenial morphology of the South American xenodontine snakes, with a proposal for a monophyletic Xenodontinae and a reappraisal of colubroid hemipenes. – *Bulletin of the American Museum of Natural History* 240:1-168.
- Zaher, H., O. Rieppel (1999): The phylogenetic relationships of *Pachyrhachis problematicus*, and the evolution of limblessness in snakes (Lepidosauria, Squamata). – *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, série Ila, Earth and Planetary Sciences* 329: 831-837.
- Zaher, H., Apesteguía, S., C.A. Scanferla (2009): The anatomy of the upper cretaceous snake *Najash rionegrina* Apesteguía & Zaher, 2006, and the evolution of limblessness in snakes. – *Zool. Journ. of the Linn. Soc.* 156: 801-826.
- Zaidner, Y. (2003): The lithic assemblage of Bizat Ruhama: Lower Paleolithic site in southern coastal plain, Israel. – M.Sc. Dissertation, Haifa University, Israel.
- Zardoya, R., A. Meyer (2001): On the origin of and phylogenetic relationships among living amphibians. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7380-7383.
- Zerova, G.A. (1992): *Vipera (Daboia) ukrainica*: a new viper (Serpentes: Viperidae) from the middle Sarmatian (Upper Miocene) of the Ukraine. – *Neues Jb. Geol. Paläont. Abh.* 184: 235-249.
- Zhou, Y.H., Brinkmann, N. Rodrigue, N., Lartillot, H. Philippe (2009): A dirichlet process covarion mixture model and its assessments using posterior predictive discrepancy tests. – *Mol. Biol. Evol.* 27: 371-384.
- Zinenko, O.I. (2003): "First generation hybrids between the Nikolsky's adder, *Vipera nikolskii*, and the common adder (Reptilia, Serpentes, Viperidae)" – *Vestnik Zool. Kiev* 37: 101-104 [in Russian].
- Zink, R.M., G.F. Barrowclough (2008): Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. – *Mol. Ecol.* 17: 2107-2121. (doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03737.x)
- Zink, R.M., Blackwell-Rago, R.C., F. Ronquist (2000): The shifting roles of dispersal and vicariance in biogeography. – *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* 267: 497-503.
- Zuckerkandl, E., L.B. Pauling (1962): Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. In: Kasha M.A., B., Pullman [eds], *Horizons in biochemistry*, New York, Academic Press, pp. 189-225.
- Zuckerkandl, E., L.B. Pauling (1965): Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson, V., H. Vogel, [eds.], *Evolving genes and proteins*, pp. 97-166, Academic Press, New York.
- Zug, G.R., Vitt, L.J., J.P. Caldwell [eds] (2001): *Herpetology*. – San Diego: Academic Press.
- Zwickl, D.J. (2006): Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence data sets under the maximum likelihood criterion. – PhD dissertation, The University of Texas, Austin, TX.

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wird die Phylogenie und Biogeographie eurasischer Viperinae unter besonderer Berücksichtigung der Gattungen *Macrovipera* und *Montivipera* in sieben Kapiteln behandelt, die im Nachfolgenden grob skizziert werden.

Nach Darstellung der Material und Methoden befasst sich Kapitel 3 mit der Phylogenie der Viperinae auf Basis vollständiger mt-Genome.

Bestehende molekulargenetische Untersuchungen (Herrmann et al. 1999, Lenk et al. 2001, Wüster et al. 2008) über die Phylogenie eurasischer Viperinae stehen partiell miteinander im Konflikt. Um die phyletische Stellung von *Vipera* zu *Macrovipera*, *Montivipera* und *Daboia* zu untersuchen, sequenzierte ich neun vollständige mt-Genome der Taxa *Vipera ammodytes*, *Vipera berus bosniensis*, *Vipera orlovii*, *Montivipera xanthina*, *Montivipera wagneri*, *Montivipera raddei kurdistanica*, *Macrovipera lebetina obtusa*, *Macrovipera lebetina turanica* und *Daboia mauritanica* de novo. Unter Hinzunahme weiterer 41 Genbanksequenzen wurden 11 proteincodierende Gene des L-Stranges in die korrespondierenden Aminosäuresequenzen übersetzt (Datensatz 3542) und für die Berechnung einer bayesianischen Amnioten-Phylogenie mit dem Programm PhyloBayes3.2d (Lartillot et al. 2007) genutzt. Die Topologie des Baumes bestätigt die mt-Genealogien der Amnioten von Albert et al. (2009) und Okajima & Kumazawa (2009). Innerhalb der Serpentes hat der Baum robuste statistische Unterstützung und spiegelt die klassische Dreigliederung der Schlangen in Scolecophidia, Henophidia und Caenophidia wider. Altweltliche Vipern (Viperinae) bilden die Schwestergruppe der Grubenottern (Crotalinae).

Die Gattungen *Montivipera* und *Macrovipera* gehen auf einen Ursprung zurück und bilden die Schwestergruppe zu *Daboia*. Im Widerspruch zu den Berechnungen von Lenk et al. (2001) und Wüster et al. (2008) ist *Vipera* die Schwestergruppe der orientalischen Gattungen *Daboia*, *Macrovipera* und *Montivipera*. Die verwandtschaftliche Beziehung wird in der vorliegenden Studie erstmals auf Basis eines umfassenden mt-Aminosäuredatensatzes sicher nachgewiesen.

Die neun vollständigen mt-Genome codieren zwei rRNAs, 22 tRNAs und 13 proteincodierende Gene und bestätigen das für Schlangen typische Arrangement mit Duplikation der Kontrollregion (CR2) zwischen ND1 und ND2 (Dong & Kumazawa 2005).

In den alignierten Schlangen-Genomen gelang es mir, eine charakteristische hochkonservierte Sequenzstruktur der Kontrollregion zu identifizieren, die bei Arten der Gattung *Vipera* verdoppelt und transloziert wurde. Der Homopolymer (Origin of Replication)

eignet sich wahrscheinlich als phylogenetischer Marker und ist bei orientalischen Vipern einmal pro Kontrollregion vorkommend, während er bei *Vipera ammodytes* zweimal und bei *Vipera orlovii* dreimal pro Kontrollregion identifiziert wurde.

Im anschließenden Kapitel 4 werden Divergenzzeiten der Viperinae auf der Basis vollständiger mt-Genome untersucht.

Die fossile Ahnenreihe eurasischer Viperinae (Viperidae) bietet weder exakte Kalibrierungspunkte, noch ist sie zur Validierung berechneter Divergenzzeiten geeignet.

Bisherige molekulare Uhren (z.B. Wüster et al. 2008), die Fossildaten eurasischer Viperinae zur zeitlichen Eichung verwendeten, sind daher nicht völlig unabhängig. Erklärtes Ziel dieses Kapitels ist es, die Knotenalter eurasischer Viperinae in einer Analyse, frei von Zirkelschlüssen zu überprüfen, um sie dann auf Koinzidenz mit geologischen Ereignissen zu prüfen (Kapitel 9).

Für die molekulare Datierung wurde ein bayesianischer Algorithmus (PhyloBayes3.2d, Lartillot et al. 2007) mit relaxierten Uhren verwendet. Als Chronometer verwendete ich zehn validierte Fossil-Eichpunkte außerhalb der Viperidae. Für den Aminosäuredatensatz 3542 des vorherigen Kapitels testete ich zunächst den Einfluss unterschiedlicher Relaxed-clock-models und Divergence-times-priors auf die Knotendivergenzzeiten. Am realistischsten koinzidierten die Divergenzzeiten des Modells UGAM mit geologischen Ereignissen. Die berechneten Divergenzzeiten für die Radiation rezenter Viperidae (49,4 Mio. Jahre) sowie das Alter des MRCA der Viperinae (39,4 Mio. Jahre) bestätigen die Analysen von Wüster et al. (2008). Interne Knotenalter der Viperinae sind jedoch zu den von Wüster et al. (2008) ermittelten Werten diskrepant und tendenziell etwas älter.

Das Kapitel 5 befasst sich mit der Phylogenie eurasischer Viperinae. Vorausgehende Publikationen erfassten nur einzelne Artengruppen (Ursenbacher et al. 2006, 2008) oder eine Auswahl weniger repräsentativer Taxa (Lenk et al. 2001, Garrigues et al. 2005). Ein Versuch, die gesamte Diversität eurasischer Vipern mit einem umfassenden Taxonsampling zu erfassen und ihre Phylogenie auf Basis von Sequenzdaten zu rekonstruieren, fehlte bislang. Zudem sind alle publizierten Stammbäume Mitochondrien-Phylogenien, die nur den maternalen Aspekt der Phylogenie abbilden. Das dem Kapitel 5 zugrunde liegende Taxonsampling erfasst etwa 90 % aller bekannten Taxa eurasischer Viperinae. Um von den 71 OTUs sowohl die cytoplasmatische (mt) als auch die autosomale (nc) evolutionäre Geschichte zu rekonstruieren, generierte ich zwei Datensätze, von denen der mt-Datensatz 1920 bp der Gene Cytb und COI umfasst. Für den zweiten Datensatz wurden 3514 Sequenzpositionen der nc-Gene Rag1 und Bach1 bestimmt. Der Bayesian-Inference-Baum der konkatenierten Kerngene bildet die mt-Topologie größtenteils äquivalent ab. Allerdings

sind basale Knoten teilweise durch Polytomien gekennzeichnet oder nicht durch robuste Posterior Probabilities gestützt. In einem Subzweig clustern Taxa, die nach morphologischen, biogeographischen Kriterien keine unmittelbare Verwandtschaft erkennen lassen.

BI-, ML- und MP-Stammbäume der kombinierten Datensätze aus mt- und nc-Genen zeigen dichotom verzweigte Topologien mit hoher statistischer Unterstützung.

Die Genealogien der unterschiedlichen Stammbaumrekonstruktionsverfahren sind in hohem Maße kongruent (KH, SH Test), zeigen aber partielle Abweichungen. So ist *Daboia* in BI- und MP-Stammbäumen die Schwestergruppe von *Macrovipera* und *Montivipera*, in der ML-Inferenz hingegen die Schwestergruppe von *Vipera*. Der BI-Baum weist nahezu für jeden Split maximale Posterior Probabilities auf (im Mittel 98,28) und besitzt die höchste Koinzidenz zu morphologischen Merkmalen.

Erstmals wird die Gattung *Vipera* in ihrer Gesamtheit phylogenetisch erfasst. Neben neuen Erkenntnissen auf dem Intra- und Interspezies-Level decken die Stammbäume eine bisher unbekannte Paraphylie der Gattung *Vipera* auf.

Im Kapitel 6 werden die Divergenzzeiten eurasischer Viperinae berechnet. Für den kombinierten mt-nc-Datensatz 5434 (1920+3514) des vorherigen Kapitels wurden mit einem bayesianischen Algorithmus (BEAST) Divergenzzeiten berechnet. Molekulare Uhren wurden für eurasische Viperinae erst von vier Autoren entwickelt. Allerdings erfassten die Arbeiten von Herrmann et al. (1992b), Ursenbacher et al. (2008), Wüster et al. (2008) und Barbanera et al. (2009) nur wenige Taxa oder ausgewählte Spezies. In der vorliegenden Arbeit werden erstmals Divergenzzeiten für alle eurasischen Viperinae berechnet. Die relaxierte Uhr kalibrierte ich mit sechs sekundären Eichpunkten aus der Divergenzzeitberechnung des Kapitels 3, die geologisch validiert sind (siehe Kapitel 9). Zeitlich korreliert die Trennung zwischen Viperinae und Crotalinae mit dem Paläo-Eozänen-Klima-Maximum (PETM) vor 52 Millionen Jahren und liegt damit innerhalb des Konfidenzintervalls der Divergenzzeitanalyse von Wüster et al. (2008). Sehr alte evolutionäre Linien stellen die Gattungen *Cerastes* und *Echis* dar. Die Radiation in die Stammlinienvertreter der eurasischen Gattungen *Eristicophis*, *Pseudocerastes*, *Daboia*, *Macrovipera*, *Montivipera* und *Vipera* gehen auf ein geologisch schmales Zeitfenster zwischen 27 und 23 Millionen Jahren zurück. Die Kronengruppen der eurasischen Viperinae sind hingegen alle jünger als 10 Millionen Jahre. Im Konflikt zu bisher publizierten Annahmen steht die Divergenzzeit der Kykladen-Viper (*Macrovipera schweizeri*). Nilson & Andrén (1988) stellten die Hypothese auf, dass sich die Kykladenvipern vor 3-5 Millionen Jahren von den festländischen Populationen getrennt hätten. Tatsächlich ist die Kykladenviper jedoch erst seit 380.000 Jahren von dem

Schwesertaxon der Insel Zypern getrennt. Bemerkenswert ist das hohe Alter der *xanthina*-Populationen und das geringe Alter rezenter *ammodytes* Haplotypen, obwohl die Stammmart zu den ältesten evolutionären Linien innerhalb von *Vipera* gehört.

Im Kapitel 7 wird die Phylogenie orientalischer Viperiden der Gattungen *Macrovipera* und *Montivipera*, *Daboia*, *Eristicophis* und *Pseudocerastes* behandelt. Die Stammesgeschichte der orientalischen Vipern der Gattung *Daboia*, *Macrovipera* und *Montivipera* wurde phasenweise so kontrovers diskutiert (vergl. Schätti et al. 1991), dass kein taxonomisch-systematischer Konsens zu erzielen war. Wüster et al. (1997) forderten daher eine umfassende molekulargenetische Revision der Gruppe. Nachfolgende Publikationen erfassten die orientalischen Vipern nur partiell (Lenk et al. 2001) oder versäumten es, statistisch robuste Stammbäume zu berechnen (siehe Garrigues et al. 2005). Die statistisch robust abgesicherten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben erstmals eine kritische Revision der gesamten Gruppe.

Für die Bayesianische Inferenz Phylogenie (MrBayes; Ronquist & Huelsenbeck 2003) wurden drei mt-Gene von 175 operational taxonomic units sequenziert (Datensatz 2566).

Die Topographie zeigt nur bedingt Übereinstimmungen zu vorherigen Sequenzphylogenien von Lenk et al. (2001), Garrigues et al. (2005) und Wüster et al. (2008). Orientalische Vipern gehen in Konkordanz zu den Genealogien aus Kapitel 3 mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück. *Daboia* ist die Schwestergruppe von *Macrovipera* und *Montivipera*. Entgegen der Annahme von Joger (1984), der nur zwei Unterarten der Art *Macrovipera lebetina* anerkennt, segregieren die Mitochondrien-Gene der Levanteottern in sechs Haplogruppen, die in Konkordanz mit der Taxonomie nomineller Subspezies sind. Darüber hinaus identifiziert die mt-Genealogie eine neue *Macrovipera*-Spezies aus dem Südiran.

Die Phylogenie innerhalb der Gattung *Montivipera* reflektiert nur teilweise die aktuelle Taxonomie. *Montivipera* gliedert sich in die zwei Schwesterkladen *xanthina* und *raddei*, von denen der *raddei*-Komplex eine genetisch junge und homogene evolutionäre Linie darstellt, die eine Auftrennung in mehrere Arten nicht rechtfertigt. Der *xanthina*-Komplex hingegen besteht aus distinkten, evolutionsgeschichtlich alten Haplogruppen, die eigenständigen taxonomischen Status verdienen. Genetische Distanzen innerhalb der Gattung *Daboia* (*mauritanica*, *palaestinae* versus *russelii*, *siamensis*) sind deutlich größer als zwischen den Gattungen *Macrovipera* und *Montivipera* und sollten konsequenterweise taxonomisch differenziert werden.



In dem Kapitel 8 wird Phylogeographie der Gattungen *Montivipera* und *Macrovipera* untersucht. Die Subkladen *Montivipera* und *Macrovipera* des Datensatzes 2566 wurden diversen phylogeographischen Tests und Analysen unterzogen. Phylogeographische Zusammenhänge bestehen für alle getesteten Subkladen. Maximum-Likelihood-Berechnungen zum geographischen Ursprung und den Migrationsrouten geben Einblicke in die Entstehungs- und Ausbreitungsgeschichte der Artkomplexe *xanthina*, *raddei* und *lebetina*, die mit Hilfe des Programmes Phylomapper (Lemmon & Moriarty Lemmon 2008) durchgeführt wurden. Der Ursprung des *xanthina*-Komplexes liegt in Westanatolien. Seine Ahnen breiteten sich hauptsächlich in westlicher, östlicher und südlicher Richtung aus und kolonisierten die Levante, Ostanatolien und sukzessive den Taurus, dessen Topographie die Architektur heutiger Haplotypen lenkte. Das europäische Festland wurde in zwei Kolonisierungsphasen von unterschiedlichen *xanthina*-Haplotypen besiedelt.

Der *raddei*-Komplex hat seinen Ursprung im Nordwestiran. Die Ahnen heutiger Haplotypen breiteten sich hauptsächlich NW-SO-Richtung aus.

Der Ort mit dem höchsten Likelihood für die Radiation von *Macrovipera lebetina* liegt nordöstlich des Urmiasees im heutigen Iran. Die Stammart teilte sich in drei evolutionäre Ahnenlinien, von denen zwei Anatolien kolonisierten, während die dritte Mittelasien eroberte. Zypern, die Kykladen und die südliche Mittelmeerküste der Türkei wurden über westanatolische Routen besiedelt.

Um die Dynamik phylogeographischer Ereignisse in Zeit und Raum zu erfassen, berechnete ich für die Bergottern *Montivipera xanthina*, *M. bornmuelleri*, *M. wagneri*, und *M. bulgardaghica* verschiedene populationsdemographische Parameter wie Summary Statistics, Mismatch-Verteilungen und effektive Populationsgrößen und korrelierte sie mit Klimaereignissen und den dadurch bedingten Veränderung von Lebensräumen. In dem Kapitel erarbeite ich die Bedeutung der *Cedrus-Abies*-Wälder für Dispersal- und Vikarianz-Ereignisse ostanatolischer Bergottern und stelle einen Zusammenhang zwischen topographischer Heterogenität, dem periodischen Wechsel von plio-pleistozänen Kalt- und Warmzeiten und der allopatrischen Speziation her.

Populationsdemographische Tests zeigen unter allen vier getesteten Gruppen (*bornmuelleri*, *wagneri*, *bulgardaghica*, *xanthina*) übereinstimmend nur für *M. wagneri* Indizien einer stark anwachsenden, sich panmiktisch fortpflanzenden Population an. Alle anderen Taxa besitzen Anzeichen von strukturierten, rückläufigen oder stabilen Populationen.

Das 9. und letzte Kapitel dieser Arbeit widmet sich der Paläobiogeographie und versucht, Prozesse wie Dispersal, Vikarianz, und Extinktion eurasischer Viperinae zu rekonstruieren.

Dazu verwendete ich zwei unterschiedliche Ansätze. Mithilfe der „Dispersal-Vicariance“-Analyse gelang es nicht, die Ursprungsgebiete der Stammarten eurasischer Viperinae zu ermitteln. Eindeutiger sind die Erkenntnisse eines interdisziplinären Ansatzes, für den ich nach Koinzidenz zwischen molekularen Divergenzzeiten aus Kapitel 4 und paläobiogeographischen Ereignissen in der zirkummediterranen Region suchte. Absolute Divergenzzeiten zwischen Linien erlauben es, eindeutige Rückschlüsse zwischen klimatischen und geologischen Effekten auf die Speziation und Ausbreitung von Organismen zu ziehen und so molekulargenetische Divergenzzeiten zu testen und zu validieren. Es ist bislang der erste Versuch, die Biogeographie eurasischer Viperinae in einem interdisziplinären Ansatz zu rekonstruieren.

Für die Rekonstruktion der paläobiogeographischen Hypothesen übertrug ich die Divergenzzeiten aus Kapitel 4 auf paläogeographische Karten von Rögl (1999) und Popov et al. (2004) und entwickelte so Szenarien zur Biogeographie eurasischer Viperinae vom späten Eozän bis zum späten Miozän, die ich mit Fossilfunden aus Szyndlar & Rage (1999) korrelierte. Insgesamt weisen die molekularen Divergenzzeiten eine hohe Übereinstimmung zu den paläogeographischen Ereignissen auf. So ist die berechnete Divergenzzeit zwischen *Daboia* und der Stammart von *Montivipera* und *Macrovipera* (26,7 Mio. Jahre) deckungsgleich mit der Isolation Kleinasiens im späten Oligozän vor 29-24 Mio. Jahren. Die Trennung zwischen der afrikanischen Stammart von *mauritanica* und der asiatischen Schwestergruppe *russelii* (18,9 Mio. Jahre) koinzidiert mit dem Kollaps der interkontinentalen Landbrücke *Gomphotherium* zwischen Afrika und Eurasien im frühen Miozän vor 17,3 Mio. Jahren. Ebenso deutlich ist die Kongruenz zwischen der erneuten Isolation Kleinasiens im mittleren Miozän vor 16-15 Mio. Jahren und der damit verbundenen Trennung der beiden Schwestertaxa *Montivipera* und *Macrovipera* vor 15,3 Mio. Jahren. Ein Seeweg, der vor 13-12,2 Mio. Jahren zwischen Paratethys und Mediterran entstand, initiierte die Auftrennung der Ahnen von *Montivipera raddei* und *Montivipera xanthina*, die sich nach molekularen Schätzungen vor 10,7 Mio. Jahren trennten.

## Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Mentor und Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Joger, der mir viel Spielraum zur Verwirklichung der Dissertation ließ und mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mit Geduld das Ende der Arbeit abwartete. Einen großen Anteil am Gelingen der Arbeit hat insbesondere Prof. Dr. Erko Stackebrand, der mir völlig uneigennützig das Arbeiten in den luxuriösen Labors der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) ermöglichte, wo ich große Hilfsbereitschaft und Kollegialität genoss. Ohne eine Rangfolge benennen zu wollen, möchte ich mich bei den Mitarbeitern der DSMZ Evelyne Brambilla, Ina Kramer, Jennifer Gregor, Nicole Mrotzek, Orsola Päuer, Dr. Peter Schumann und Dr. Cathrin Sproer für ihre große Unterstützung im Labor bedanken. Dr. Willi Dirks und Dr. Johannes Sikorski, beide aus der DSMZ, hatten stets für experimentelle und theoretische Fragen ein offenes Ohr und inspirierten mich durch ihre Diskussionsbeiträge. Für externe Laborunterstützung und Kooperation bedanke ich mich bei Dr. Michael Knapp (MPI für evolutionäre Anthropologie, Leipzig), Prof. Dr. Miguel Vences, Dr. Susanne Hauswaldt von der TU-Braunschweig. Miguel, Dir danke ich natürlich auch sehr für die Betreuung der Arbeit.

Das Nutzfahrzeugzentrum Hannover, vertreten durch Jochen Schumm, (Mitglied des Markenvorstandes Volkswagen Nutzfahrzeuge) förderte meine Forschungsreisen in die Türkei und den Iran durch die zur Verfügungstellung eines tollen Autos, das leider arg strapaziert wurde. Ihm gebührt ein großes Dankeschön. Benny Trapp, Khosro Rajabizadeh und Hiwa Fizi waren freundschaftliche, zuverlässige Begleiter, Kollegen und Dolmetscher. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Ibrahim Baran (Ege Universitesi Izmir) für seine Kooperationsbereitschaft.

Ein ganz herzliches Dankeschön richte ich auch an die Kollegen, Freunde und Bekannten, die mir Probenmaterial aus ihren Privatsammlungen zur Verfügung stellten, als da wären Peter van Issem, Selami Tomruk, Joseph Schmidler, Ralf Halwas, Alexander Westerström, Antonius Schwaaf, Alexander Zinenko und Roland Zirbs.

Diverse finanzielle Zuschüsse aus meinem familiären Umfeld und Bekanntenkreis erleichterten es mir, wirtschaftliche Durststrecken zu überstehen. So bedanke ich mich bei meinen Eltern Klaus und Dorothee Stümpel für Reise-, Miet- und Versicherungszuschüsse sowie kleinere Förderungen durch die Familie Kasch-Moritz, die der Bequemlichkeit des Alltages zugute kamen.

Bei meiner Partnerin Imke Glameyer, die sich auf die Suche nach den Fehlerteufeln begab, bedanke ich mich für das Korrekturlesen.

# Anhang

Appendix A: Probenverzeichnis "Orientalische Vipern" (*Montivipera*, *Macrovipera*, *Daboia*, *Pseudocerastes*, *Eristicophis*) sowie verwandte Gattungen und Außengruppen (*Echis*, *Cerastes*, *Bitis*, *Sistrurus*).

Sequenzierte Gene	Label	Spezies	Herkunft	Fundort	Land	Longitude	Latitude
Cytb,COI,ND5,Ragl,BachI	pl1	<i>Daboia palaestinae</i>	Pvl	?	?	?	?
Cytb,COI,ND5	pl6	<i>Daboia palaestinae</i>	UJ	Irbid	JOR	32,56	35,76
Cytb,COI,ND5	rs1	<i>Daboia russelii</i>	Pvl	Java	RI	-7,35	109,85
Cytb,COI,ND5	rs9	<i>Daboia russelii</i>	UJ	?	PAK	?	?
Cytb,COI,ND5,Ragl,BachI	rs10	<i>Daboia russelii</i>	MTD 32497	Hikkaduwa	CL	7,36	80,79
Cytb,COI,ND5	lb6	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	NS	Shährüd-river-Valley,	IR	6,47	50,66
Cytb,COI,ND5	lb7	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	NS	Shährüd-river-Valley	IR	36,47	50,66
Cytb,COI,ND5,Ragl,BachI	lb9	<i>Macrovipera lebetina euphratica</i>	17925	Dört'd (Dörtöl bei Iskenderun)	TR	36,84	36,22
Cytb,COI,ND5,Ragl,BachI	lb10	<i>Macrovipera lebetina lebetina</i>	Pvl	Zypern	GR	34,71	32,57
Cytb,COI,ND5	lb11	<i>Macrovipera lebetina lebetina</i>	Pvl	Zypern	GR	35,13	32,84
Cytb,COI,ND5	lb12	<i>Macrovipera lebetina lebetina</i>	Pvl	Zypern	GR	34,71	32,57
Cytb,COI,ND5	lb13	<i>Macrovipera lebetina lebetina</i>	Pvl	Zypern	GR	34,71	32,57
Cytb,COI,ND5,Ragl,BachI	lb14	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	Pvl	?	AZ	40,00	47,00
Cytb,COI,ND5	lb15	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	Pvl	?	AZ	40,00	47,00
Cytb,COI,ND5	lb16	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	ZMB 47851	Mittleres Kuratal	AZ	41,32	45,53
Cytb,COI,ND5	lb17	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	ZMB 47852	Mittleres Kuratal	AZ	41,32	45,53
Cytb,COI,ND5	lb18	<i>Macrovipera lebetina euphratica</i>	UJ	Gaz.. (Gaziantep?)	TR	37,06	37,38
Cytb,COI,ND5	lb19	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	Pvl	Nuratau	UZ	40,25	67,00
Cytb,COI,ND5	lb20	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	Pvl	Nuratau	UZ	40,25	67,00
Cytb,COI,ND5	lb21	<i>Macrovipera lebetina</i>	JS	Ceyhan	TR	37,05	35,77
Cytb,COI,ND5	lb22	<i>Macrovipera lebetina euphratica</i>	JS	Altınözü, Antakya	TR	36,12	36,25
Cytb,COI,ND5	lb23/43	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	UJ	Naraty Mts.	UZ	41,31	70,03
Cytb,COI,ND5	lb23/44	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	UJ	Naraty Mts.	UZ	41,31	70,03
Cytb,COI	lb23/45	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	UJ	Zaamin	UZ	39,71	68,47
Cytb,COI,ND5	lb23/46	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	UJ	Zaamin	UZ	39,71	68,47
Cytb,COI,ND5	lb24	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	17469	Sirit	TR	37,21	42,59
Cytb,COI,ND5,Ragl,BachI	lb26	<i>Macrovipera lebetina cernovi</i>	ERP	Bojnourd,Khorasan Prov.	IR	37,58	57,48
Cytb,COI,ND5	lb27	<i>Macrovipera lebetina cernovi</i>	ERP	Zamanabad, Semnan Prov.	IR	37,18	57,17
Cytb,COI,ND5	lb28	<i>Macrovipera lebetina cernovi</i>	ERP	Zamanabad, Semnan Prov.	IR	37,18	57,17
Cytb,COI,ND5,Ragl,BachI	lb29	<i>Macrovipera spec.</i>	ERP	Kerman, Jirot/Baft Mts.	IR	29,19	57,32
Cytb,COI,ND5	lb30	<i>Macrovipera spec.</i>	ERP	Kerman, Jirot/Baft Mts.	IR	29,19	57,32
Cytb,COI,ND5	lb31	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	GN	Koped Dag	TM	37,40	60,00
Cytb,COI,ND5	lb32	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	GN	Nuratau?? Koped Dag?	TM	40,25	67,00
Cytb,COI,ND5	lb33	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	ZISP 27715(2)	Kotayk region, Hrazdan	ARM	40,53	44,74
Cytb,COI,ND5	lb34	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	ZISP 27737(2)	Qumlaq, Cəbrayıl	AZ	39,17	46,92
Cytb,COI,ND5,Ragl,BachI	lb35	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	Pvl	?	AZ	39,73	67,04
Cytb,COI,ND5	lb38	<i>Macrovipera lebetina schweizeri</i>	MTD 39640	Mersin	TR	36,83	34,58
Cytb,COI,ND5	lb41	<i>Macrovipera lebetina cernovi</i>	MTD 9013	?	PAK	36,28	73,05
Cytb,COI,ND5	lb42	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	MTD 31292	Iskenderun	TR	36,44	36,20
Cytb,COI,ND5	lb46	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	MTD 18731	Varzob-Schlucht Dushanbe	TJ	38,69	68,79
Cytb partiell, ND5	lb47	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	MTD 23584	Varzob-Schlucht Dushanbe	TJ	38,69	68,79
Cytb,COI,ND5	lb49	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	MTD 18349	Bobotoq' Tizmasi	TJ	38,13	68,20
Cytb,COI,ND5	lb50	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	MTD 25191	Tigrovaja Balka	TJ	37,42	68,58
Cytb,COI,ND5	lb51	<i>Macrovipera lebetina cernovi</i>	MTD 20723	Termes	UZ	37,22	67,28
Cytb,COI,ND5	lb52	<i>Macrovipera lebetina cernovi</i>	MTD 20724	Termes	UZ	37,22	67,28
Cytb,COI,ND5	lb55	<i>Macrovipera lebetina cernovi</i>	MTD 11383	Tschaa Basar (River Murghob)	TJ	38,12	73,92
Cytb,COI partiell, ND5	lb56	<i>Macrovipera lebetina cernovi</i>	MTD 11528	Tschaa Basar (River Murghob)	TJ	38,12	73,92
Cytb,COI,ND5	lb57	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	MTD 11531	Ordshonikidsobad, Romit	TJ	38,74	69,35
Cytb,COI,ND5	lb59	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	MTD 24714	Umgebung Jerewan	ARM	40,14	44,70
Cytb,COI,ND5	lb60	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	MTD 24715	Umgebung Jerewan	ARM	40,14	44,70
Cytb,COI,ND5, part.Ragl,BachI	lb63	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	RO	Nuratau	UZ	40,25	67,00
Cytb,COI,ND5,Ragl,BachI	mr1	<i>Macrovipera mauritanica mauritanica</i>	Pvl	Quarzazate	MA	30,83	-6,90
Cytb,COI,ND5	mr4	<i>Macrovipera mauritanica mauritanica</i>	VMW 3 ery	Quarzazate	MA	30,83	-6,90
Cytb,COI	mr5	<i>Macrovipera mauritanica mauritanica</i>	HLMD 1182	Tan-Tan	MA	28,29	-10,30
Cytb,COI,ND5	dsSKH	<i>Macrovipera mauritanica deserti</i>	UJ	Djebel Nefusa	TN	32,13	10,57
Cytb,COI,ND5,Ragl,BachI	ds2	<i>Macrovipera mauritanica deserti</i>	UJ	Djebel Nefusa	TN	32,13	10,57
Cytb,COI,ND5	sw3	<i>Macrovipera lebetina schweizeri</i>	Pvl	Milos	GR	36,68	24,43
Cytb,COI,ND5	sw4	<i>Macrovipera lebetina schweizeri</i>	Pvl	Milos	GR	36,68	24,43

## Fortsetzung Appendix A

Sequenzierte Gene	Label	Spezies	Herkunft	Fundort	Land	Longitude	Latitude
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	sw5	<i>Macrovipera lebetina schweizeri</i>	BT	Milos	GR	36,68	24,43
Cytb,COI,ND5	sw6	<i>Macrovipera lebetina schweizeri</i>	BT	Milos	GR	36,68	24,43
Cytb,COI,ND5	sw7	<i>Macrovipera lebetina schweizeri</i>	NS	Milos	GR	36,68	24,43
Cytb,COI,ND5	sw9	<i>Macrovipera lebetina schweizeri</i>	GN	Milos	GR	36,68	24,43
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	sw10	<i>Macrovipera lebetina schweizeri</i>	BT	Milos	GR	36,68	24,43
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	ac1	<i>Montivipera cf. albicornuta</i>	NS	Khân Shây	IR	36,64	48,97
Cytb,COI,ND5	ac2	<i>Montivipera cf. albicornuta</i>	NS	Khân Shây	IR	36,64	48,97
Cytb,COI,ND5	ac3	<i>Montivipera cf. albicornuta</i>	NS	Khân Shây	IR	36,64	48,97
Cytb,COI,ND5	ac4	<i>Montivipera cf. albicornuta</i>	NS	Khân Shây	IR	36,64	48,97
Cytb,COI,ND5	ac5	<i>Montivipera cf. albicornuta</i>	NS	Khân Shây	IR	36,64	48,97
Cytb,COI,ND5	ac6	<i>Montivipera cf. albicornuta</i>	NS	Khân Shây	IR	36,64	48,97
Cytb,COI,ND5	ac7	<i>Montivipera cf. albicornuta</i>	NS	Khân Shây	IR	36,64	48,97
Cytb,COI,ND5	ac14	<i>Montivipera raddei raddei</i>	KR	Qotur	IR	38,46	44,37
Cytb,COI,ND5	ac11	<i>Montivipera raddei raddei</i>	KR	Maku	IR	39,26	44,44
Cytb,COI,ND5	ac12	<i>Montivipera raddei raddei</i>	KR	Maku	IR	39,26	44,44
Cytb,COI,ND5	ac8	<i>Montivipera cf. albicornuta</i>	KR	Tekab Mts.	IR	36,45	47,26
Cytb,COI,ND5	ac9	<i>Montivipera cf. albicornuta</i>	KR	Tekab Mts.	IR	36,45	47,26
Cytb,COI,ND5	ac10	<i>Montivipera cf. albicornuta</i>	KR	Sahand	IR	37,67	46,47
Cytb,COI,ND5	ac13	<i>Montivipera cf. albicornuta</i>	KR	Tekab Mts.	IR	36,45	47,26
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	az3	<i>Montivipera cf. albizona</i>	Pvl	Kulmaç Dağları	TR	39,53	35,91
Cytb,COI,ND5	az4	<i>Montivipera cf. albizona</i>	Pvl	Kulmaç Dağları	TR	39,53	35,91
Cytb,COI,ND5	az5	<i>Montivipera cf. albizona</i>	18020	Kulmaç Dağları	TR	39,00	37,00
Cytb,COI,ND5	az6	<i>Montivipera cf. albizona</i>	UJ	?	TR	39,00	37,00
Cytb,COI,ND5	az7	<i>Montivipera cf. albizona</i>	VMW 6mu	Pınarbaşı	TR	38,70	36,50
Cytb,COI,ND5	az9	<i>Montivipera cf. albizona</i>	GN	Terra typica ?	TR	39,00	37,00
Cytb,COI,ND5	bm1	<i>Montivipera bornmuelleri</i>	JS	Bsharri	RL	34,25	36,01
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	bm6	<i>Montivipera bornmuelleri</i>	VVR1	?	?	34,25	36,01
Cytb	bm8	<i>Montivipera bornmuelleri</i>	MTD 26209	Golan	SYR	33,30	35,80
Cytb,COI,ND5	bm9	<i>Montivipera bornmuelleri</i>	MTD 39648	?	?	33,35	35,82
Cytb,COI,ND5	bm10	<i>Montivipera bornmuelleri</i>	MTD 25679	Mt. Hermon	SYR	33,35	35,82
Cytb,COI,ND5	bm11	<i>Montivipera bornmuelleri</i>	MTD 31308	Mt Hermon	IL	33,35	35,82
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	bg3	<i>Montivipera bulgardaghica</i>	NS	Arslanköy	TR	37,04	34,29
Cytb,COI,ND5	bg4	<i>Montivipera bulgardaghica</i>	NS	Arslanköy	TR	37,04	34,29
Cytb,COI,ND5	bg5	<i>Montivipera bulgardaghica</i>	NS	Arslanköy	TR	37,04	34,29
Cytb,COI,ND5	bg10	<i>Montivipera bulgardaghica</i>	17465	Kar Boaz	TR	37,37	34,77
Cytb,COI,ND5	bg12	<i>Montivipera bulgardaghica</i>	196 Mus.Genf	Bolkar Dağları	TR	37,29	34,59
Cytb,COI,ND5	bg13	<i>Montivipera bulgardaghica</i>	SKH	?	TR	37,29	34,59
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	bg16	<i>Montivipera bulgardaghica</i>	Pvl	Türkei	TR	37,50	35,00
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	lt2	<i>Montivipera latifii</i>	KR	Lar valley, Albortz Mts.	IR	35,97	51,83
Cytb,COI,ND5	lt5	<i>Montivipera latifii</i>	KR	Lar valley, Albortz Mts.	IR	35,97	51,83
Cytb,COI,ND5	lt6	<i>Montivipera latifii</i>	KR	Lar valley, Albortz Mts.	IR	35,97	51,83
Cytb,COI,ND5	lt7	<i>Montivipera latifii</i>	KR	Lar valley, Albortz Mts.	IR	35,97	51,83
Cytb,COI,ND5	lt8	<i>Montivipera latifii</i>	KR	Lar valley, Albortz Mts.	IR	35,97	51,83
Cytb,COI,ND5	rk1	<i>Montivipera raddei kurdistanica</i>	NS	Yüksekova	TR	37,66	44,26
Cytb,COI,ND5	rk3	<i>Montivipera raddei kurdistanica</i>	Pvl	Yüksekova	TR	37,66	44,26
Cytb,COI,ND5	rk7	<i>Montivipera raddei kurdistanica</i>	NS	Yüksekova	TR	37,66	44,26
Cytb,COI,ND5	rk8	<i>Montivipera raddei kurdistanica</i>	NS	Yüksekova	TR	37,66	44,26
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	rk10	<i>Montivipera raddei kurdistanica</i>	Pvl	Yüksekova	TR	37,66	44,26
Cytb,COI,ND5	rr1	<i>Montivipera raddei raddei</i>	Pvl	Ararat ?	TR	39,60	44,27
Cytb,COI,ND5	rr2	<i>Montivipera raddei raddei</i>	Pvl	Ararat?	TR	39,60	44,27
Cytb,COI,ND5	rr3	<i>Montivipera raddei raddei</i>	Pvl	Ararat ?	TR	39,60	44,27
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	rr5	<i>Montivipera raddei raddei</i>	ZISP 27739(2)	Yeghegnadzor Saravan	region, ARM	39,80	45,37
Cytb,COI,ND5	rr6	<i>Montivipera raddei raddei</i>	ZISP 27722(2)	Kotayck region, Kaputan	ARM	40,30	44,72
Cytb,COI,ND5	rr7	<i>Montivipera raddei raddei</i>	GN	Digor	TR	40,30	43,36
Cytb	rr8	<i>Montivipera raddei raddei</i>	UJ	Digor	TR	40,30	43,36
Cytb	rrD	<i>Montivipera raddei raddei</i>	UJ	Digor	TR	40,30	43,36
Cytb,COI,ND5	rr9	<i>Montivipera raddei raddei</i>	FS	?	?	?	?
Cytb,COI,ND5	rr10	<i>Montivipera raddei raddei</i>	FS	?	?	?	?

## Fortsetzung Appendix A

Sequenzierte Gene	Label	Spezies	Herkunft	Fundort	Land	Longitude	Latitude
Ragl,Bachl	rr12	<i>Montivipera raddei raddei</i>	NS	?	ARM	?	?
ND5	rr17	<i>Montivipera raddei raddei</i>	MTD 12514	Byurakan	ARM	40,35	44,27
COI,ND5	rr19	<i>Montivipera raddei raddei</i>	MTD 16867	60 km nördl. Jerewan	ARM	40,70	44,50
COI	rr20	<i>Montivipera raddei raddei</i>	MTD 16868	60 km nördl. Jerewan	ARM	40,70	44,50
Cytb,COI,ND5	rr21	<i>Montivipera raddei raddei</i>	UJ	Van Gölü, Muradiye	TR	38,89	43,81
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	wg3	<i>Montivipera wagneri</i>	NS	Aras Nehri	TR	40,14	42,68
Cytb,COI,ND5	wg4	<i>Montivipera wagneri</i>	NS	Aras Nehri	TR	40,14	42,68
Cytb,COI,ND5	wg5	<i>Montivipera wagneri</i>	NS	Aras Nehri	TR	40,14	42,68
Cytb,COI,ND5	wg6	<i>Montivipera wagneri</i>	NS	Aras Nehri	TR	40,14	42,68
Cytb,COI,ND5	wg7	<i>Montivipera wagneri</i>	Pvl	Aras Nehri	TR	40,10	42,70
Cytb,COI,ND5	wg8	<i>Montivipera wagneri</i>	Pvl	Aras Nehri	TR	40,10	42,70
Cytb,COI,ND5	wg9	<i>Montivipera wagneri</i>	UJ	Horasan	TR	40,01	42,30
Cytb,COI,ND5	wg10	<i>Montivipera wagneri</i>	17462	Sankamış	TR	40,30	42,60
Cytb,COI,ND5	wg11	<i>Montivipera wagneri</i>	SKH	Karakurt	TR	40,10	42,70
Cytb,COI,ND5	wg12	<i>Montivipera wagneri</i>	S□H	Karakurt	TR	40,10	42,70
Cytb,COI,ND5	wg13	<i>Montivipera wagneri</i>	UJ	Karakurt	TR	40,10	42,70
Cytb,COI,ND5	wg15	<i>Montivipera wagneri</i>	NS	Karakurt	TR	40,10	42,70
Cytb,COI,ND5	wg16	<i>Montivipera wagneri</i>	NS	Ahras Nehri ?	TR	40,10	42,70
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	xt1	<i>Montivipera xanthina</i>	NS	Tekir Dağ	TR	40,80	27,37
Cytb,COI,ND5	xt2	<i>Montivipera xanthina</i>	NS	Tekir Dağ	TR	40,80	27,37
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	xt4	<i>Montivipera xanthina</i>	NS	Geyik Dağı	TR	36,80	32,30
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	xt5	<i>Montivipera xanthina</i>	NS	Geyik Dağı	TR	36,80	32,30
Cytb□COI,ND5	xt6	<i>Montivipera xanthina</i>	NS	Geyik Dağı	TR	36,80	32,30
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	xt8	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Isparta	TR	37,70	31,00
Cytb,COI,ND5	xt9	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Isparta	TR	37,70	31,00
Cytb,COI,ND5	xt11	<i>Montivipera xanthina</i>	17459	Izmi	TR	38,30	26,94
Cytb,COI,ND5	xt12	<i>Montivipera bulgardaghica</i>	18017	Bolkar Dağları	TR	37,20	34,40
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	xt15	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Selçuk	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5	xt16	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Selçuk	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5	xt17	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Selçuk	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5	xt18	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Selçuk	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5	xt19	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Selçuk	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5	xt20	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Selçuk	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5	xt21	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Selçuk	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5	xt22	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Selçuk	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5	xt23	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Selçuk	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5	xt24	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Selçuk	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	xt25	<i>Montivipera xanthina</i>	NS	Olympos	TR	36,43	30,42
Cytb,COI,ND5	xt26	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Tekirova	TR	36,51	30,52
Cytb,COI,ND5	xt27	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Tekirova	TR	36,51	30,52
Cytb,COI,ND5	xt28	<i>Montivipera xanthina</i>	BT	Loutrós	GR	40,87	26,06
Cytb,COI,ND5	xt29	<i>Montivipera xanthina</i>	BT	Loutrós	GR	40,87	26,06
Cytb,COI,ND5	xt30	<i>Montivipera xanthina</i>	Pvl	Kos	GR	36,80	27,20
Cytb,COI,ND5	xt31	<i>Montivipera xanthina</i>	Pvl	Kohu Dağ	TR	36,51	29,94
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	xt32	<i>Montivipera xanthina</i>	Pvl	Kohu Dağ	TR	36,51	29,94
Cytb,COI,ND5	xt36	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Kumluca	TR	36,35	30,33
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	xt37	<i>Montivipera xanthina</i>	ST	Tekirova	TR	36,51	30,52
Cytb,CO□,ND5	xt40	<i>Montivipera xanthina</i>	NMW 26549	Kratigos, Lesvos	GR	39,23	26,09
Cytb,COI,ND5	xt42	<i>Montivipera xanthina</i>	NMW 32709	Ephesos	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5	xt42	<i>Montivipera xanthina</i>	SKH	?	TR	?	?
Cytb,COI,ND5	xt43	<i>Montivipera xanthina</i>	SKH	?	TR	?	?
Cytb,COI,ND5	xt45	<i>Montivipera xanthina</i>	AW	Loutrós	GR	40,87	26,06
Cytb,COI,ND5	xt46	<i>Montivipera xanthina</i>	AW	Loutrós	GR	40,87	26,06
Cytb,COI,ND5,Ragl	xt47	<i>Montivipera xanthina</i>	BT	Loutrós	GR	40,87	26,06
Cytb,COI,ND5	xt48	<i>Montivipera xanthina</i>	MTD 33558	Kos	GR	36,80	27,20
Cytb,COI,ND5	xt50	<i>Montivipera xanthina</i>	MTD 26181	Adape (Adage)	TR	?	?
Cytb,COI,ND5	xt52	<i>Montivipera xanthina</i>	NS	Ephesos	TR	37,93	27,33
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	spec.1	<i>Montivipera cf. albizona</i>	JS	Göksun	TR	37,90	36,50

## Fortsetzung Appendix A

Sequenzierte Gene	Label	Spezies	Herkunft	Fundort	Land	Longitude	Latitude
Cytb,COI,ND5	hyb1	<i>Montivipera xanthina, wagneri</i>	NS	Aras Nehri x Tekir Dağ	TR	40,80	27,37
Cytb,COI,ND5,part.Ragl	em3	<i>Eristicophis macmahonii</i>	UJ	Chagai Distr. Balochistan	PAK	29,12	64,79
COI,ND5,Ragl,Bachl	pf1	<i>Pseudocerastes fieldii</i>	UJ	?	ET	?	?
ND5	pf2	<i>Pseudocerastes fieldii</i>	UJ	Sinai	ET	29,30	34,10
Cytb,COI,ND5,Ragl	Pf3	<i>Pseudocerastes fieldii</i>	UJ	?	JOR	30,61	36,34
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	ba2	<i>Bitis arietans</i>	NS	?	ZA	?	?
Ragl,Bachl	cc1	<i>Cerastes cerastes</i>	RO	?	ET	?	?
Ragl,Bachl	cc4	<i>Cerastes cerastes</i>	UJ	?	ADN	?	?
Ragl,Bachl	cc7	<i>Cerastes cerastes</i>	UJ	Süd Tunesien	TN	?	?
Ragl,Bachl	cc8	<i>Cerastes cerastes</i>	UJ	Sinai	ET		
Ragl,Bachl	cv5	<i>Cerastes vipera</i>	UJ	?	?	?	?
Cytb,Ragl,Bachl	bh1	<i>Echis leucogaster</i>	UJ	Bou Hedma	TN	34,50	9,50
Ragl,Bachl	smb	<i>Sistrurus miliarius barbouri</i>	RO	?	?	?	?

Verwendete Abkürzungen: BT = Benny Trapp; ERP = Eskandar Rastegar-Pouyani; GN = Göran Nilson; JS = Josef Schmidtler; KR = Khosro Rajabisadeh; NS = Nikolaus Stümpel; Pvl = Peter van Issem; RH = Ralf Haelker; RO = Ralf Oehler; SKH = Svetlana Kalyabina-Hauf; ST = Selami Tomruk; UJ = Ulrich Joger; HLMD = Hessisches Landesmuseum Darmstadt; NMW = Naturhistorisches Museum Wien; MTD = Museum für Tierkunde Dresden; ZBM = Zoologisches Museum Berlin; ZISP = Zoological Institute (Acad. Sci.) St. Petersburg



Appendix B: Probenverzeichnis "Europäische Vipern" der Gattung *Vipera*.

Sequenzierte Gene	Label	Spezies	Fundort/ Herkunft	Land	Sammlung
Cytb,COI	11	<i>Vipera nikolskii</i>	Moldova, Vulkaneshty	MD	AZ/UJ
Ragl,BachI	17	<i>Vipera berus berus</i>	Svaljava District, Pojana	UA	AZ/UJ
Cytb,COI	25	<i>Vipera berus berus</i>	Ukraine, Chernivtsi reg., Hotin distr., Poljana	UA	AZ/UJ
Cytb,COI	50	<i>Vipera berus berus</i>	Nova Sloboda, Monastery	UA	AZ/UJ
Cytb,COI	108	<i>Vipera berus berus</i>	Kanev	UA	AZ/UJ
Cytb,COI,Ragl,BachI	132	<i>Vipera nikolskii</i>	Молдова, Отаки, Унгры-Рудь	MD	AZ/UJ
Ragl,BachI	136	<i>Vipera nikolskii</i>	Молдова, Ниспорены, Вулканешты	MD	AZ/UJ
Cytb,COI	162	<i>Vipera berus berus</i>	Спадщина и Кардаши, ур. Гусинец	UA	AZ/UJ
Cytb,COI	168	<i>Vipera berus berus</i>	с. Биласовица, г. Пикуй	UA	AZ/UJ
Cytb,COI	B1	<i>Vipera renardi</i>	Schuchinsk Distr., Lake Burabaj (Borovoe)	KZ	AZ/UJ
Cytb,COI	B2	<i>Vipera renardi</i>	Schuchinsk Distr., Lake Burabaj (Borovoe)	KZ	AZ/UJ
Cytb,COI	B3	<i>Vipera renardi</i>	Schuchinsk Distr., Lake Burabaj (Borovoe)	KZ	AZ/UJ
Cytb	B4	<i>Vipera renardi</i>	Schuchinsk Distr., Lake Burabaj (Borovoe)	KZ	AZ/UJ
Cytb	Giesengr.	<i>Vipera berus berus</i>	Giesegrund	D	AZ/UJ
Cytb,COI,Ragl,BachI	kz1	<i>Vipera kaznakovii</i>	Hopa	TR	AS/NS
Cytb,COI	kz2	<i>Vipera kaznakovii</i>	Hopa	TR	AS/NS
Cytb,COI	kz3	<i>Vipera kaznakovii</i>	Hopa	TR	AS/NS
Cytb	kz4	<i>Vipera kaznakovii</i>	Hopa	TR	AS/NS
Cytb	kz5	<i>Vipera kaznakovii</i>	Hopa	TR	AS/NS
Cytb	kz6	<i>Vipera kaznakovii</i>	Hopa	TR	AS/NS
Cytb	kz7	<i>Vipera kaznakovii</i>	Hopa	TR	AS/NS
Cytb	kz8	<i>Vipera kaznakovii</i>	Hopa	TR	AS/NS
Cytb	kz9	<i>Vipera kaznakovii</i>	Hopa	TR	AS/NS
Cytb,COI,Ragl,BachI	ltg1	<i>Vipera latastei gaditana</i>	Ain Draham	TN	RH/NS
Cytb,COI	ltg2	<i>Vipera latastei gaditana</i>	Huelva	E	RH/NS
Cytb,COI,Ragl,BachI	ltl1	<i>Vipera latastei latastei</i>	Soria	E	RO/NS
Cytb,COI,Ragl,BachI	ltl2	<i>Vipera latastei latastei</i>	Castellon	E	RH/NS
Cytb,COI	ltl3	<i>Vipera latastei latastei</i>	?	E	Pv/NS
Cytb,COI	ltl5	<i>Vipera latastei latastei</i>	Deva	E	Pv/NS
Cytb,COI,ND5	ltl6	<i>Vipera latastei latastei</i>	Soria (?)	E	RH/NS
Cytb,COI	v1	<i>Vipera berus bosniensis</i>	Pirin Gebirge, unterhalb Gipfel Vihren, etwa 2400m	BG	AZ/UJ
Cytb,COI	v14	<i>Vipera berus bosniensis</i>	Varnous oder Varnoudas Gebirge	GR	AZ/UJ
Cytb,COI	v16	<i>Vipera barani</i>	Trabzon	TR	AZ/UJ
Cytb,COI	v17	<i>Vipera barani</i>	Trabzon	TR	AZ/UJ
Cytb,COI	V28	<i>Vipera renardi baschkirovi</i>	?	RUS	AZ/UJ
Cytb,COI	V29	<i>Vipera renardi baschkirovi</i>	?	RUS	AZ/UJ
Cytb,COI	v4	<i>Vipera berus bosniensis</i>	Vitosha 1300m	BG	AZ/UJ
Cytb,COI	v5	<i>Vipera berus bosniensis</i>	Rila Gebirge, Yundula	BG	AZ/UJ
Ragl,BachI	v61	<i>Vipera berus bosniensis</i>	Osogovo-Gebirge, 1600m	BG	AW/UJ
Cytb,COI	v7	<i>Vipera berus bosniensis</i>	Osogovo-Gebirge,1600m	BG	AZ/UJ
Cytb,COI	Va1	<i>Vipera ammodytes</i>	Monte Simeone	I	NS/NS
Cytb partiell,COI,Ragl,BachI	Va10	<i>Vipera ammodytes</i>	Skutarisee	CG	Pv/NS
Cytb,COI,Ragl,BachI	Va11	<i>Vipera ammodytes</i>	Igoumenitsa	GR	?/UJ
Cytb,COI	Va3	<i>Vipera ammodytes</i>	Lavant Tal	AUT	RZ/NS
Cytb,COI,ND5	Va4	<i>Vipera ammodytes</i>	Opatja	HR	NS/NS
Cytb,COI,ND5,Ragl,BachI	Va6	<i>Vipera ammodytes</i>	Krk	HR	RO/NS
Cytb,COI,Ragl,BachI	Va9	<i>Vipera ammodytes</i>	Skutarisee	CG	Pv/NS
Cytb,COI	Vaf1	<i>Vipera aspis francisciredi</i>	Maiella	I	Pv/NS
Cytb,COI,Ragl,BachI	Vaf2	<i>Vipera aspis francisciredi</i>	Maiella	I	Pv/NS
Cytb,COI	Vaf5	<i>Vipera aspis francisciredi</i>	Eisacktal 25km n. Bozen	I	NS/NS
Cytb,COI,Ragl,BachI	Vah1	<i>Vipera aspis hugyi</i>	Kalabrien	I	Pv/NS
Cytb,Ragl,BachI	Van1	<i>Vipera antolica</i>	Elmali, Kohu Dag	TR	?/UJ
Cytb,COI	Vas1	<i>Vipera aspis aspis</i>	Tiengen	D	?/UJ
Cytb,COI,Ragl,BachI	Vas2	<i>Vipera aspis aspis</i>	Schweiz	CH	?/UJ
Cytb,COI	Vat7	<i>Vipera ammodytes transcaucasiana</i>	Ada Pasari	TR	RO/NS
Cytb,COI,Ragl,BachI	Vat8	<i>Vipera ammodytes transcaucasiana</i>	Artvin	TR	RH/NS

## Fortsetzung Appendix B

Sequenzierte Gene	Label	Spezies	Fundort	Land	Herkunft/Sammlung
Cytb,COI,Ragl,Bachl	Vba1	<i>Vipera barani</i>	Trabzon	TR	Kutrup/UJ
Cytb,COI,Ragl,Bachl	Vbb1	<i>Vipera berus berus</i>	Bournemouth Dorset	UK	?/UJ
Cytb,COI	Vbb3	<i>Vipera berus berus</i>	Woking Surrey	UK	?/UJ
Cytb,COI	Vbb4	<i>Vipera berus bosniensis</i>	Pirin Mts. 10km soth of Bansko	BG	YS/UJ
Cytb,COI	Vbb5	<i>Vipera berus berus</i>	Göteborg	S	?/UJ
Cytb,COI	Vbb6	<i>Vipera berus berus</i>	Anglesey	UK	?/UJ
Cytb,COI	Vbb7	<i>Vipera berus berus</i>	Kosyin	UA	?/UJ
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	Vbbs1	<i>Vipera berus bosniensis</i>	Save?	?	PvI/NS
Cytb,COI	Vbbs3	<i>Vipera berus bosniensis</i>	Šator, 8.6.02	BIH	YS/UJ
Cytb,COI	Vbbs4	<i>Vipera berus bosniensis</i>	Dinara, 20.7.02	BIH	YS/UJ
Cytb,COI	Vbbs5	<i>Vipera berus berus</i>	Panair, Korab (Maja Korabit), 2250m	AL	AW/UJ
Cytb,COI	Vbbs6	<i>Vipera berus berus</i>	Carev Do, Bjelasica, 1600m	CG	AW/UJ
Cytb,COI	Vbbs7	<i>Vipera berus bosniensis</i>	Svatovsko Groblje, Bjelasica	CG	AW/UJ
Cytb,COI,Ragl,Bachl	Vlot1	<i>Vipera lotievii</i>	?	?	PvI/NS
Cytb,COI,Ragl,Bachl	Vm1	<i>Vipera monticola</i>	Toubkal, 2895müNN, 03.06.2007	MA	AW/UJ
Cytb,COI,ND5,Ragl,Bachl	Vo2	<i>Vipera orlovii</i>	Tula	RUS	PvI/NS
Cytb,COI	Vo3	<i>Vipera orlovii</i>	Tula	RUS	PvI/NS
Cytb,COI	Vo4	<i>Vipera orlovii</i>	?	RUS	PvI/NS
Cytb,COI	Vpo1	<i>Vipera pontica</i>	?	TR	?/UJ
Cytb,COI	Vr1	<i>Vipera ursinii</i>	Esenaj Village, Uraslk. District	KZ	?/UJ
Cytb,COI	Vr11	<i>Vipera renardi</i>	Rostov	KZ	?/UJ
Cytb,COI	Vr12	<i>Vipera renardi</i>	Rostov	KZ	?/UJ
Cytb,COI	Vr13	<i>Vipera renardi</i>	2003	UZ	?/UJ
Cytb,COI	Vr16	<i>Vipera renardi</i>	Turgai River	KZ	?/UJ
Cytb,COI	Vr2	<i>Vipera ursinii</i>	Esenaj Village, Uraslk. District	KZ	?/UJ
Cytb,COI	Vr3	<i>Vipera ursinii</i>	Janbejty Village, Ulenty River	KZ	?/UJ
COI	Vr4	<i>Vipera ursinii</i>	Sassykkol Lake, nördl. Almatay District	KZ	?/UJ
Cytb,COI	Vr5	<i>Vipera renardi</i>	Volgograd	RUS	?/UJ
Cytb,COI	Vr6	<i>Vipera renardi</i>	Volgograd, Sarzepta	RUS	?/UJ
Cytb,COI,Ragl,Bachl	Vr7	<i>Vipera renardi</i>	Berg Zolotaja, Uljanovskaja Mts.	RUS	?/UJ
Cytb,COI,Ragl,Bachl	Vr8	<i>Vipera renardi</i>	Volgograd, Sarzepta	RUS	?/UJ
Cytb,COI	Vr9	<i>Vipera renardi</i>	Berg Zolotaja, Uljanovskaja lib.	RUS	?/UJ
Cytb,COI,Ragl,Bachl	Vss1	<i>Vipera seonaei</i>	Nordspanien	ES	?/UJ
Cytb,COI	Vss3	<i>Vipera seonaei</i>	?	ES	?/UJ
Cytb,COI	Vss4	<i>Vipera seonaei</i>	?	ES	?/UJ
Cytb,COI	Vue1	<i>Vipera ebneri</i>	Laar-Tal 2004	IR	NS/NS
Cytb,COI,Ragl,Bachl	Vum1	<i>Vipera ursinii macrops</i>	Dinara, 20.7.02	BIH	YS/UJ
Cytb,COI	Vum10	<i>Vipera ursinii macrops</i>	Korab (Maja Korabit), 1680m	AL	AW/UJ
Cytb,COI	Vum11	<i>Vipera ursinii macrops</i>	Korab (Maja Korabit), 1660m	AL	AW/UJ
Cytb,COI,Ragl,Bachl	Vum2	<i>Vipera ursinii macrops</i>	Dinara, 19.7.02	BIH	YS/UJ
Cytb,COI	Vum3	<i>Vipera ursinii macrops</i>	Dinara, 20.7.02	BIH	YS/UJ
Cytb,COI	Vum4	<i>Vipera ursinii macrops</i>	Sar Planina	MK	?/UJ
Cytb,COI	Vum5	<i>Vipera ursinii macrops</i>	Maglic	CG	?/UJ
Cytb,COI	Vum6	<i>Vipera ursinii macrops</i>	Sar Planina	MK	?/UJ
Cytb,COI,Ragl,Bachl	Vum8	<i>Vipera ursinii macrops</i>	Durmitor	CG	?/UJ
Cytb,COI	Vum9	<i>Vipera ursinii macrops</i>	?	?	?/UJ
Cytb,COI	Vur1	<i>Vipera ursinii rakosiensis</i>	Cluj	RO	PvI/NS
Cytb,COI	Vur2	<i>Vipera ursinii rakosiensis</i>	Cluj	RO	PvI/NS
Cytb,COI	Vur3	<i>Vipera ursinii rakosiensis</i>	?	?	?/UJ
Cytb,COI	Vuu1	<i>Vipera ursinii ursinii</i>	?	I	?/UJ
Cytb,COI,Ragl,Bachl	Vuu2	<i>Vipera ursinii ursinii</i>	?	I	?/UJ
Cytb,COI	Vuu3	<i>Vipera ursinii ursinii</i>	?	I	?/UJ
Cytb,COI,Ragl,part.Bachl	Vuw1	<i>Vipera ursinii wettsteini</i>	?	F	?/UJ

Verwendete Abkürzungen: AS = Antonius Schwaaf; AW = Alexander Westerström; AZ = Alexander Zinenko; NS = Nikolaus Stümpel; PvI = Peter van Issem; RH = Ralf Haelker; RO = Ralf Oehler; RZ = Roland Zirbs; UJ = Ulrich Joger; YS = Yure Skejič

Appendix C: Verzeichnis der verwendeten Fremdsequenzen des Datensatzes 3542 (die Buchstabenkombination identifiziert in Verbindung mit der Nummer die Datenbanksequenz).

Quelle	Spezies	Gen
gi 49616802 NC_005958.1	<i>Abronia graminea</i>	complete mt-genome
gi 156878356 NC_009768.1	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	complete mt-genome
gi 5835540 NC_001922.1	<i>Alligator mississippiensis</i>	complete mt-genome
gi 52221080 NC_006284.1	<i>Amphisbaena schmidtii</i>	complete mt-genome
gi 74310505 NC_007398.1	<i>Boa constrictor</i>	complete mt-genome
gi 209886953 NC_011393.1	<i>Bungarus fasciatus</i>	complete mt-genome
gi 209886981 NC_011392.1	<i>Bungarus multicinctus</i>	complete mt-genome
gi 14190593 NC_002744.2	<i>Caiman crocodilus</i>	complete mt-genome
gi 264681156 NC_013479.1	<i>Causus defilippi</i>	complete mt-genome
gi 240266570 NC_012836.1	<i>Chalarodon madagascariensis</i>	complete mt-genome
gi 5836002 NC_000886.1	<i>Chelonia mydas</i>	complete mt-genome
gi 74310586 NC_007401.1	<i>Cylindrophis rufus</i>	complete mt-genome
gi 209886939 NC_011391.1	<i>Daboia russellii</i>	complete mt-genome
gi 164420851 NC_010223.1	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	complete mt-genome
gi 5835568 NC_001945.1	<i>Dinodon semicarinatus</i>	complete mt-genome
gi 238866932 NC_012770.1	<i>Elaphe poryphyracea</i>	complete mt-genome
gi 164420865 NC_010200.1	<i>Enhydryis plumbea</i>	complete mt-genome
gi 121622405 NC_008777.1	<i>Furcifer oustaleti</i>	complete mt-genome
gi 5834843 NC_001323.1	<i>Gallus gallus</i>	complete mt-genome
gi 83309043 NC_007627.1	<i>Gekko gekko</i>	complete mt-genome
gi 209886925 NC_011390.1	<i>Gloydus blomhoffii brevicaudus</i>	complete mt-genome
gi 14193045 NC_002793.1	<i>Iguana iguana</i>	complete mt-genome
gi 114052884 NC_008328.1	<i>Lacerta viridis viridis</i>	complete mt-genome
gi 121582620 NC_008775.1	<i>Lepidophyma flavimaculatum</i>	complete mt-genome
gi 49616774 NC_005961.1	<i>Leptotyphlops humilis</i>	complete mt-genome
gi 62198713 NC_006914.1	<i>Mus musculus domesticus</i>	complete mt-genome
sp Q9MLJ3	<i>Naja kaouthia</i>	Cytb
tr B7SSP6	<i>Naja kaouthia</i>	ND4
tr D2ISM1	<i>Naja mossambica</i>	Cytb
tr D2ISV3	<i>Naja mossambica</i>	ND4
gi 164420837 NC_010225.1	<i>Naja naja</i>	complete mt-genome
tr D2ISN1	<i>Naja nigricollis</i>	Cytb
tr A8HD41	<i>Naja nigricollis</i>	ND4
gi 209886967 NC_011394.1	<i>Ophiophagus hannah</i>	complete mt-genome
gi 3293006 AJ001588.1	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	complete mt-genome
gi 74487323 NC_007397.1	<i>Ovophis okinavensis</i>	complete mt-genome
gi 156878370 NC_009769.1	<i>Pantherophis slowinskii</i>	complete mt-genome
gi 62184508 NC_006922.1	<i>Pogona vitticeps</i>	complete mt-genome
gi 74310572 NC_007399.1	<i>Python regius</i>	complete mt-genome
gi 110189662 AC_000022.2	<i>Rattus norvegicus</i>	complete mt-genome
gi 31324892 NC_004815.1	<i>Sphenodon punctatus</i>	complete mt-genome
gi 240266340 NC_012816.1	<i>Thermophis zhaoermii</i>	complete mt-genome
gi 190349356 NC_010974.1	<i>Varanus salvator</i>	complete mt-genome
gi 224588084 NC_012146.1	<i>Viridovipera stejnegeri stejnegeri</i>	complete mt-genome
gi 74310600 NC_007402.1	<i>Xenopeltis unicolor</i>	complete mt-genome
gi 5834981 NC_001573.1	<i>Xenopus laevis</i>	complete mt-genome

Fortsetzung Appendix C: Verzeichnis der von mir de novo sequenzierten mt-Genome des Datensatzes 3542.

Quelle	Spezies	Gen
De-novo-Sequenzierung	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	complete mt-genome
De-novo-Sequenzierung	<i>Vipera berus bosniensis</i>	complete mt-genome
De-novo-Sequenzierung	<i>Vipera orlovii</i>	complete mt-genome
De-novo-Sequenzierung	<i>Montivipera xanthina</i>	complete mt-genome
De-novo-Sequenzierung	<i>Montivipera wagneri</i>	complete mt-genome
De-novo-Sequenzierung	<i>Montivipera raddei</i>	complete mt-genome
De-novo-Sequenzierung	<i>Macrovipera lebetina turanica</i>	complete mt-genome
De-novo-Sequenzierung	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	complete mt-genome
De-novo-Sequenzierung	<i>Daboia mauritanica</i>	complete mt-genome

## **Publikationen**

### **Originalarbeiten**

- (1) Meyer, F., Knapp, R. & N. Stümpel (1997): Verbreitung und Erfassungsstand des Springfrosches (*Rana dalmatina* Bonaparte, 1840) in Sachsen-Anhalt und Südost Niedersachsen. – *Hercynia* 30: 287-302, Halle.
- (2) Stümpel, N. (2001): Die Horn- oder Sandotter *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758) in Südtirol, Italien. – *Herpetofauna* 23: 9-18, Weinstadt.
- (3) Stümpel, N. (2004): Individualmarkierung des Springfrosches (*Rana dalmatina*) mit Hilfe von Fledermausringen. – *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 11: 203-212.
- (4) Stümpel, N. & W-R. Große (2005): Phänologie, Aktivität und Wachstum von Springfröschen (*Rana dalmatina*) in unterschiedlichen Sommerlebensräumen in Südostniedersachsen. – *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 12: 71-99.
- (5) Stümpel, N. & U. Joger (2009): Recent advances in phylogeny and taxonomy of Near and Middle Eastern Vipers – an update. – *Zookeys* 31: 179-191.
- (6) Pook, C.E., Joger, U., Stümpel, N. & W. Wüster (2009): When continents collide: Phylogeny, historical biogeography and systematic of the medically important viper genus *Echis* (Squamata: Serpentes: Viperidae). – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 297-807.

### **Kurzmitteilungen**

- (7) Stümpel, N. & B. Trapp (2006): *Vipera xanthina* (Gray 1849), Bergotter. – *Reptilia* 51-54.

### **Buchbeiträge**

- (8) Stümpel, N. & B. Lehmann (2004): Springfrosch - *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840, 126-132 - In: Meyer, F., Buschendorf, J., Zupke, U., Braumann, F., Schädler, M. & W-R. Große [eds.], *Die Amphibien und Reptilien Sachsen-Anhalts-Verbreitungsatlas*. Laurenti-Verlag, Bielefeld.
- (9) Joger, U. & N. Stümpel (2005): *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III*, Aula-Verlag.
- (10) Stümpel, N., Brito, J.C. & H. Saint-Girons (2005): *Vipera (Vipera) latastei* – Stülpnasenotter, S. 187-212. – In: Joger, U. & N. Stümpel [eds.]: *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III*, Aula-Verlag.
- (11) Heckes, U., Gruber, H-J. & N. Stümpel (2005): *Vipera (Vipera) ammodytes* – Hornotter, Sandvipser, S. 81-150. – In: Joger, U. & N. Stümpel [eds.]: *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III*, Aula-Verlag.
- (12) Joger, U. & N. Stümpel (2005): *Viperidae – Vipern*, S. 77-79. – In: Joger, U. & N. Stümpel [eds.]: *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III*, Aula-Verlag.
- (13) Joger, U. & N. Stümpel (2005): *Macrovipera* Reuss, 1927, S. 23-24. – In: Joger, U. & N. Stümpel [eds.]: *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Schlangen (Serpentes) III*, Aula-Verlag.
- (14) Stümpel, N. (2007): Die Schlange in ihrer Umwelt, S.39-52 – In: Joger, U & J. Luckhardt [eds.]: *Schlangen und Drachen*, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.

- (15) Stümpel, N. (2007): Das Liebesleben der Schlangen, S. 66-73 – In: Joger, U & J. Luckhardt [eds.]: Schlangen und Drachen, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.
- (16) Stümpel, N. (2007): Schlange und Mensch, S.78-83 – In: Joger, U & J. Luckhardt [eds.]: Schlangen und Drachen, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.

### **Tagungsbeiträge und Poster**

#### **Oral communications**

- 2007 Stümpel, N. & U. Joger: “First steps towards a molecular phylogeny of Near- and Middle East Mountain and Blunt-nosed vipers of the genera *Montivipera* and *Macrovipera*” – 2<sup>nd</sup> Biology of the Vipers conference, 24-27 September 2007, Porto, Portugal
- 2007 Pook, C.E., Joger, U., Stümpel, N., McCarthy, C.J. & W. Wüster: “Molecular phylogeny and quantitative trait analysis of the genus *Echis*” – 2<sup>nd</sup> Biology of the Vipers conference, 24-27 September 2007, Porto, Portugal
- 2008 Stümpel, N. & U. Joger: “Phylogeny of Near and Middle East Mountain and Blunt-nosed Vipers of the genera *Montivipera* and *Macrovipera* inferred by three mitochondrial markers” – 6<sup>th</sup> World Congress of Herpetology, 17-22 August 2008, Manaus, Brasil
- 2009 Stümpel, N. & U. Joger: “Phylogeny of Near and Middle East Mountain and Blunt-nosed Vipers of the genera *Montivipera* and *Macrovipera* inferred by mitochondrial and nuclear markers” – 15<sup>th</sup> European Congress of Herpetology, 28<sup>th</sup> September to 2<sup>nd</sup> October 2009, Kuşadası, Turkey
- 2010 Zinenko, O., Stümpel, N. & U. Joger: “Updated phylogeography of the *Vipera berus* complex with emphasis on *V. nikolskii* mt haplotype” – 3<sup>rd</sup> Biology of the Vipers conference, 31<sup>st</sup> -2<sup>nd</sup> April 2010, Pisa, Italy
- 2010 Joger, U., Stümpel, N. & O. Zinenko: “Phylogeography of Caucasian vipers (*Vipera kaznakovi* and *V. renardi* complexes)” – 46. DGHT Jahrestagung 1. bis 5. September 2010, Frankfurt am Main
- 2010 Stümpel, N. & U. Joger: “Phylogeny and molecular clock analyses of west Palearctic Vipers based on complete mitochondrial genomes” – 3<sup>rd</sup> Biology of the Vipers conference, 31<sup>st</sup> -2<sup>nd</sup> April 2010, Pisa, Italy

#### **Poster**

- 2007 Rajabizadeh, M., Stümpel, N. & B. H. Kiabi: “Geographic variability and taxonomy of the *Montivipera raddei* species group (Reptilia, Viperidae) in Iran – a morphological approach” – 14th European congress of herpetology, Porto, Portugal
- 2010 Joger, U., Stümpel, N. & O. Zinenko: “Biodiversity and Evolution of the Middle Asian and and Caucasian vipers (Viperidae)” – International Symposium Volkswagen Foundation, 7-9 June, Bishkek, Kirgistan